

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**MARIA CAROLINA DE ARAUJO MELO**

**ESTUDO TEÓRICO CONFORMACIONAL DA DELTA-TOXINA E  
TEÓRICO-EXPERIMENTAL DA INTERAÇÃO DE COMPLEXOS DE  
COBRE-BASE DE SCHIFF COM O CANAL IÔNICO DA ALFA-  
TOXINA DE *Staphylococcus aureus***

**Recife**

**2015**

**MARIA CAROLINA DE ARAUJO MELO**

**ESTUDO TEÓRICO CONFORMACIONAL DA DELTA-TOXINA E  
TEÓRICO-EXPERIMENTAL DA INTERAÇÃO DE COMPLEXOS DE  
COBRE-BASE DE SCHIFF COM O CANAL IÔNICO DA ALFA-  
TOXINA DE *Staphylococcus aureus***

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Inovação  
Terapêutica da Universidade Federal de  
Pernambuco, para a obtenção do Título de  
Mestre em Inovação Terapêutica.**

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues**

**Recife**

**2015**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Melo, Maria Carolina de Araújo**

**Estudo teórico conformacional da delta-toxina e teórico-experimental da interação de complexos de cobre-base de Schiff com o canal iônico da alfa-toxina de *Staphylococcus aureus*/ Maria Carolina de Araújo Melo– Recife: O Autor, 2015.**

**69 folhas: il., fig., tab.**

**Orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.**

**Inclui referência e anexos**

- 1. *Staphylococcus aureus* 2. Infecção 3. Drogas- resistência em micro-organismos I. Rodrigues, Cláudio Gabriel (orientador) II. Título**

**579.353**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-076**

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

## **Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

### **REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

### **VICE-REITOR**

Prof. Dr. Silvio Romero Marques

### **PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

### **DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

### **VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

### **COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Maira Galdino da Rocha Pitta

### **VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: MELO, Maria Carolina de Araujo

Título: Estudo Teórico Conformacional da Delta-toxina e Teórico-Experimental da Interação de Complexos de Cobre-Base de Schiff com o Canal Iônico da Alfa-toxina de *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 12 / 07 / 2015

### Banca Examinadora

Dra. Dijanah Cota Machado

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:\_\_\_\_\_

Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Assinatura:\_\_\_\_\_

Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:\_\_\_\_\_

Dra. Adriana Fontes (Suplente)

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:\_\_\_\_\_

Dra. Paloma Lys de Medeiros (Suplente)

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:\_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha filha, Maria Luiza, luz da minha vida, que ilumina e enche meus dias de alegria única e exclusivamente por fato de existir. Quem esteve comigo em todas as etapas da execução dessa dissertação. Melhor apoio e incentivo eu não poderia ter.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que tem feito em minha vida e pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Cláudio Gabriel Rodrigues, agradecerei infinitamente pela orientação, oportunidade, confiança, tempo dedicado e também pela enorme compreensão sempre de forma tão gentil.

Ao Prof. Oleg Vladimirovich Krasilnikov “*In memorian*”, a pedra fundamental de tudo, pelo exemplo de vida.

Ao meu esposo, Laércio, por ser meu amigo, meu companheiro, meu analista, meu psicólogo, meu conselheiro, por sempre estar disposto a me ouvir, pela calma muitas vezes a ponto de ser estressante, por acreditar em mim e sonhar junto comigo.

À minha família, principalmente à minha mãe, por ser meu norte, minha base, por seu apoio, por não me deixar esquecer meus sonhos e lutar por eles junto comigo.

À Dijanah e Janilson, pela amizade, por sempre terem uma palavra positiva, por sempre estarem dispostos a ajudar, por serem essas pessoas maravilhosas que quero sempre por perto.

À Juliana Aguiar, minha amiga, companheira de laboratório. Amiga de todas as horas, amizade que quero levar para o resto da minha vida.

A todos do Laboratório de Biofísica das Membranas, em especial: Sheila, Layse, Gisele, pela amizade, pelo estímulo, pela família LBM-CT.

A professora Ana Maria da Costa Ferreira, por ceder os compostos de cobre.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio sempre que solicitada.

À Paulo pela disponibilidade em auxiliar na resolução de pendências burocráticas no decorrer desta tarefa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas e amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para realização desse trabalho.

Muito Obrigada!!!

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)*



## RESUMO

MELO, M. C. A. ESTUDO TEÓRICO CONFORMACIONAL DA DELTA-TOXINA E TEÓRICO-EXPERIMENTAL DA INTERAÇÃO DE COMPLEXOS DE COBRE-BASE DE SCHIFF COM O CANAL IÔNICO DA ALFA-TOXINA DE *Staphylococcus aureus*. 2015. 069f. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O *Staphylococcus (S.) aureus* é responsável por inúmeros casos de infecções em animais e seres humanos. Essa bactéria secreta uma grande variedade de exoproteínas, incluindo quatro hemolisinas: alfa, beta, gama e delta. A atividade hemolítica da alfa-toxina ( $\alpha$ -HL) se deve a formação de poros em membranas celulares. A  $\alpha$ -HL é um monômero solúvel em água, que se torna mais estável ao se oligomerizar e formar poros heptaméricos transmembranares. Devido sua importância na patogênese bacteriana, essa proteína tem sido alvo de estudos no desenvolvimento de agentes terapêuticos. Sabe-se que os compostos de base de Schiff têm apresentado significativos resultados em testes de atividade biológica, incluindo antibacteriana. Neste contexto, avaliou-se a atividade de complexos de cobre-base de Schiff no bloqueio de poros da  $\alpha$ -HL de *S. aureus*. Simultaneamente, foram realizados estudos conformacionais da  $\delta$ -toxina em solução aquosa. Experimentos com eritrócitos de coelho expostos a  $\alpha$ -HL foram utilizados na seleção dos compostos. Membranas lipídicas planas artificiais com canais individuais de  $\alpha$ -HL, em condições de fixação de voltagem, foram utilizados para entender o mecanismo de ação dos compostos. Finalmente, avaliou-se através de *docking* molecular a interação entre os compostos e o canal de  $\alpha$ -HL, visando corroborar o mecanismo de bloqueio. No estudo da  $\delta$ -toxina, dinâmica molecular foi usada para determinar sua conformação em solução aquosa. Observou-se que os complexos de cobre inibiram parcialmente a atividade hemolítica da  $\alpha$ -HL, devido ao bloqueio parcial dos canais desta toxina. O mecanismo molecular desse bloqueio ocorre pela interação dos compostos com a região de constrição do poro. Observou-se ainda que a  $\delta$ -toxina em solução aquosa apresenta de 5 a 14 resíduos enovelados. Sugere-se que os complexos de cobre são potenciais candidatos a futuros agentes coadjuvantes no tratamento de infecções por *S. aureus*.

**Palavras-chave:** composto de cobre – base de Schiff; antibacteriano;  $\alpha$ -toxina; canal iônico.

## ABSTRACT

MELO, M. C. A. THEORETICAL STUDY OF DELTA-TOXIN CONFORMATION AND EXPERIMENTAL-THEORETICAL STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN BASE SCHIFF – COPPER COMPLEXES WITH *Staphylococcus aureus* ALFATOXIN IONIC CHANNEL. 2015. 069f. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Staphylococcus (S.) aureus* is responsible for a great number of infections in animals and humans. This bacteria produces several exoproteins and virulence factors, including four hemolysins: alpha, beta, gamma and delta. The alpha-toxin ( $\alpha$ -HL) hemolytic activity occurs due to the formation of pores in cellular membranes.  $\alpha$ -HL is a soluble monomer in water, but becomes more stable when oligomerize and form transmembranar heptameric pores. Considering its importance for bacterial pathogenesis, this protein has been target of studies on new antimicrobial agents. For example, base Schiff copper compounds have been observed to show significative results in biological activity assays, including antibacterial. In this context, the present work intended to evaluate the activity of a base Schiff-copper compounds to block the *S. aureus*  $\alpha$ -HL ion channel. The most effective compounds were selected based on the exposition of rabbit erythrocytes to  $\alpha$ -HL, and tested against control conditions. The mechanism of action of these compounds were evaluated through single channel experiments in planar lipid bilayers, through electrophysiological techniques. Finally, molecular docking studies were employed to confirm the blocking mechanism of such compounds. Moreover, molecular dynamics simulations were used to determine  $\delta$ -toxin conformation in aqueous solutions. The obtained results indicated that the copper(II) compounds were capable of partially blocking the  $\alpha$ -HL hemolytic activity, due to partial blockade of the ionic channels. The molecular mechanism of pore blockade was identified to mainly occur due to the interaction of the compounds to the pore constriction. Additionally, it was observed that  $\delta$ -toxin in aqueous solution presents from 5 to 14 amino acids showing  $\alpha$ -helical content. Based on these results, we suggest that such compound may be further evaluated as a coadjuvante agent for the treatment of staphylococcal infections.

**Keywords:** Isatin, Schiff base copper (II), antibacterial,  $\alpha$ -hemolysin, ion channel.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1:</b> (A) Abscesso causado por infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> ; (B) cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio ágar sangue mostrando em (b) a coloração dourada, de onde origina o nome da espécie; (C) fotografia de <i>Staphylococcus aureus</i> em microscopia de varredura; (D) coloração de Gram, mostrando a tonalidade roxa e sua característica Gram positiva. Adaptado de RIT, 2014..... | 23   |
| <b>Figura 2:</b> Estrutura tridimensional da $\delta$ -toxina de <i>Staphylococcus aureus</i> . As dimensões da proteína estão representadas pelas linhas verticais e horizontais. <b>PDB código 1DTC</b> .....                                                                                                                                                                                                              | 25   |
| <b>Figura 3:</b> Modelo do nanoporo formado pela $\alpha$ -HL de <i>Staphylococcus aureus</i> . (A) Vista lateral, (B) vista superior, (C) representação do nanoporos inserido na membrana. As barras verticais indicam o comprimento de cada região e o diâmetro do nanoporos com dimensões e entradas em relação à membrana. <b>PDB código 7AHL</b> .....                                                                  | 27   |
| <b>Figura 4:</b> Surgimento de alguns antibióticos e cepas resistentes do <i>Staphylococcus aureus</i> nos Séculos XX e XXI. MRSA significa <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina; VRSA é a sigla para <i>S. aureus</i> resistentes à vancomicina; CA-MRSA significa <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina de origem comunitária. Adaptado de (SANTOS <i>et al.</i> , 2007).....                                     | 32   |
| <b>Figura 5:</b> Ilustração do Composto Cu(Isapn). Em cima uma representação 2D e em baixo a representação 3D.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 37   |
| <b>Figura 6:</b> Esquema da montagem experimental para os estudos com canal unitário. (A) Desenho da câmara experimental formada por duas hemicâmaras separadas por uma película de Teflon® com um orifício (aproximadamente 80 $\mu$ m de diâmetro) para a formação da bicamada lipídica plana. (B) Montagem das duas monocamadas lipídicas. A deposição de cada uma das monocamadas lipídicas                              |      |

ocorre com a introdução de mais solução em cada um dos respectivos compartimentos da câmara. (C) A membrana lipídica com um único nanoporo inserido. (D) Modelo da passagem de corrente iônica através do nanoporo. Adaptado de NESTOROVICH e BEZRUKOV, 2012..... 41

**Figura 7:** Sistema de Aquisição eletrônica do poro formado pela  $\alpha$ -HL. A) Modelo da câmara de Teflon<sup>®</sup>. B) Canal de  $\alpha$ -HL incorporado na bicamada lipídica. © Diagrama da interface eletrônica de aquisição dos registros de corrente. Adaptado de STEFUREAC, 2012..... 42

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                          | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Tabela 1:</b> Toxinas produzidas pelo <i>S. aureus</i> que participam dos mecanismos de patogenicidade e de resistência a esse patógeno. Adaptado de SANTOS <i>et al.</i> , 2007..... | 24   |
| <b>Tabela 2:</b> Mecanismos de resistência a alguns antibióticos por <i>S. aureus</i> . Adaptado de LOWY, 2003.....                                                                      | 31   |

## LISTA DE DADOS DO MANUSCRITO 1

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>FIGURE 1.</b> Anti-hemolytic activity of copper(II) complexes. Erythrocytes exposure to the 1.5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (up triangles), 0.8 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (down triangles), 0.4 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (diamonds) of (A) $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$ and (B) $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ . (squares) Negative control assay, (circles) positive control assay. Data are the mean $\pm$ SD for at least four experiments. .... | 50   |
| <b>FIGURE 2.</b> Effects of copper(II) complexes in the single $\alpha$ -HL channel. The ionic current through a single $\alpha$ -HL in the absence (A) and presence of 100 mM of $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$ (B-C, blue records) and $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ (D-E, red records). Transmembrane potential: 40 mV (A-B and D); 60 mV (C and E). .....                                                                                                   | 50   |
| <b>FIGURE 3.</b> Voltage dependence of the copper(II) complexes effects. The channel conductance in the absence of copper complex was considered as 100% (control). The channel conductance in the presence of copper(II) complexes was relativized as the control condition. Data are the mean $\pm$ SD for at least four experiments. ....                                                                                                                                              | 51   |
| <b>Table 1.</b> Contacts between Cu(isapn) and $\alpha$ -HL amino acid residues and domains.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 51   |
| <b>FIGURE 4.</b> Docked Cu(isapn) onto $\alpha$ -HL constriction regions of the channel. In (A), the four conformers are represented in the context of the entire protein. In (B), Cu(isapn) molecular structure is shown. In (C), a proposal for the ion channel blockade with three compounds is presented. The binding poses derived from Autodock (D and E) and Dockthor (F and G) are also shown in the constriction region.....                                                     | 51   |

## LISTA DE DADOS DO MANUSCRITO 2

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>Pág.</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <p><b>Figure 1.</b> MD simulations of <math>\delta</math>-toxin monomers in water and methanol environments. In (A-B), representative structures for each trajectory are shown presented in ribbon diagram. In (C-D), the root mean square fluctuation (RMSF) analyses for the final 100 ns of MD calculations are presented. In (E-F), the ellipticity at 222 nm is shown, representing the % of time in which each residue present a helical character, as analyzed for the second half of simulations.....</p> | <b>54</b>   |
| <p><b>Table 1.</b> Secondary structure content, as analyzed with DSSP, for the monomeric <math>\delta</math>-toxin MD simulations .....</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>54</b>   |
| <p><b>Table 2.</b> Clustering analyses on the performed MD simulations.....</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>55</b>   |
| <p><b>Figure 2.</b> Monomeric <math>\delta</math>-toxin behavior as observed through MD simulations using the GROMOS 54A7 force field, starting from the most representative structures of AMBER99 and OPLS-AA MD simulations in water. In (A-B), the initial and the MD most representative structures are presented in ribbon diagram for (A) AMBER99 and (B) OPLS-AA. In (C), the ellipticity at 222 nm is shown (% of time in which the residues have a helical character) .....</p>                          | <b>56</b>   |

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

|              |                                                                                                                                                          |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ala          | Alanina                                                                                                                                                  |
| ADAM10       | Uma proteína contendo o domínio desintegrina e metaloproteinase 10 (do inglês: <i>A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i> ) |
| AMP-c        | monofosfato de adenosina cíclico (do inglês: <i>cyclic adenosin monophosphate</i> )                                                                      |
| $\alpha$ -HL | Alfa-hemolisina                                                                                                                                          |
| bzim         | Benzimidazol                                                                                                                                             |
| DNA          | ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i> )                                                                                     |
| DPHPC        | Diftanoilglicerofosfocolina (do inglês: <i>1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine</i> )                                                        |
| EPS          | substâncias poliméricas extracelulares (do inglês: <i>extracellular polymeric substances</i> )                                                           |
| fen          | Fenantrolina                                                                                                                                             |
| Glu          | Glutamato                                                                                                                                                |
| <i>hla</i>   | antígeno leucocitário humano (do inglês: <i>human leukocyte antigen</i> )                                                                                |
| Lac          | Lactato                                                                                                                                                  |
| Lys          | lisina                                                                                                                                                   |
| MRSA         | <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (do inglês: <i>methicillin-resistant S. aureus</i> )                                               |
| PBP2A        | proteína de ligação à penicilina 2 <sup>a</sup> (do inglês: <i>penicillin binding protein 2A</i> )                                                       |
| PDB          | <i>Protein Data Bank</i>                                                                                                                                 |
| PVL          | leucocidina Pantón-Valentine (do inglês: <i>Panton-Valentine leukocidin</i> )                                                                            |
| RMSD         | desvio médio quadrático (do inglês: <i>root mean square deviation</i> )                                                                                  |
| RMSF         | flutuação média quadrática (do inglês: <i>root mean square fluctuation</i> )                                                                             |
| TSST-1       | toxina da síndrome do choque tóxico (do inglês: <i>Toxic shock syndrome toxin-1</i> )                                                                    |
| Thr          | treonina                                                                                                                                                 |
| Val          | Valina                                                                                                                                                   |



## LISTA DE SÍMBOLOS

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| Å                | angstrom                 |
| Ag               | prata                    |
| AgCl             | cloreto de prata         |
| C                | concentração             |
| °C               | Grau Celsius             |
| Ca <sup>+2</sup> | cálcio                   |
| ClO <sub>4</sub> | perclorato               |
| Cu               | cobre                    |
| G                | condutância              |
| HCl              | Ácido clorídrico         |
| I                | Corrente elétrica        |
| KCl              | cloreto de potássio      |
| kDa              | quilodalton              |
| kHz              | quilohertz               |
| $K_d$            | constante de equilíbrio  |
| $k_{off}$        | constante de dissociação |
| $k_{on}$         | constante de associação  |
| M                | Molar                    |
| MΩ               | MegaOhm                  |
| m                | massa                    |
| min              | minuto                   |
| mL               | mililitro                |
| mM               | milimolar                |
| ms               | milisegundo              |
| mV               | milivolt                 |
| μL               | microlitro               |
| μm               | micrômetro               |
| μM               | micromolar               |
| ng/ml            | nanograma por mililitro  |
| nm               | nanômetro                |
| O <sub>2</sub>   | oxigênio                 |

|                      |                          |
|----------------------|--------------------------|
| $\text{p}\text{\AA}$ | picoampere               |
| pH                   | potencial de hidrogênio  |
| ®                    | registered               |
| $\text{SO}_4$        | sulfonato                |
| V                    | voltagem                 |
| v                    | volume                   |
| $\alpha$             | alfa                     |
| $\beta$              | beta                     |
| $\gamma$             | gama                     |
| $\delta$             | delta                    |
| T                    | temperatura              |
| $\tau$               | tau                      |
| $\tau_{off}$         | tempo de residência      |
| $\tau_{on}$          | tempo entre os bloqueios |
| $\Delta G$           | energia de interação     |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                                     |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                             | <b>18</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                              | <b>21</b> |
| 2.1      | Geral .....                                                                                                                                                         | 21        |
| 2.2      | Específicos .....                                                                                                                                                   | 21        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                                                                                                  | <b>22</b> |
| 3.1      | <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                                                                                  | 22        |
| 3.1.1    | Deltatoxina.....                                                                                                                                                    | 24        |
| 3.1.2    | Alfatoxina.....                                                                                                                                                     | 26        |
| 3.2      | Resistência aos Antibióticos.....                                                                                                                                   | 30        |
| 3.3      | Infecção e Transmissão.....                                                                                                                                         | 33        |
| 3.4      | Estudo Prospectivo de Inibidores e Bloqueadores de Alfatoxina.....                                                                                                  | 34        |
| 3.4.1    | Design de moléculas de interesse biológico.....                                                                                                                     | 35        |
| 3.5      | Complexos de Cobre – Bases de Schiff.....                                                                                                                           | 35        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA .....</b>                                                                                                                                            | <b>39</b> |
| 4.1      | Ensaio de atividade hemolítica de alfatoxina.....                                                                                                                   | 39        |
| 4.2      | Construção das membranas artificiais.....                                                                                                                           | 40        |
| 4.3      | Sistema eletrônico de aquisição e registro da corrente iônica.....                                                                                                  | 41        |
| 4.4      | A síntese dos complexos de cobre(II)-base de Schiff derivados da Isatina ..                                                                                         | 42        |
| 4.5      | Análise experimental da interação dos compostos de cobre com o canal da<br>alfatoxina.....                                                                          | 43        |
| 4.6      | Análise teórica da interação dos compostos de cobre com o canal da<br>Alfatoxina.....                                                                               | 44        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                             | <b>44</b> |
| 5.1      | Artigo 1: Inhibition of the hemolytic activity caused by <i>Staphylococcus<br/>aureus</i> $\alpha$ -hemolysin through isatin-Schiff base copper(II) complexes ..... | 48        |
| 5.2      | Artigo 2: Monomeric <i>Staphylococcus aureus</i> $\delta$ -toxin behavior in aqueous<br>solution.....                                                               | 53        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                             | <b>59</b> |
| <b>7</b> | <b>PERSPECTIVAS .....</b>                                                                                                                                           | <b>60</b> |
| <b>8</b> | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                            | <b>61</b> |
| <b>9</b> | <b>ANEXOS .....</b>                                                                                                                                                 | <b>68</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma bactéria aeróbia, Gram-positiva e esférica frequentemente encontrada na pele e fossas nasais de indivíduos saudáveis (ELWARD *et al.*, 2009). Esses cocos Gram positivos em forma de cachos são  $\beta$ -hemolíticos, coagulase, maltose e manitol positivos e formadores de colônias pigmentadas; quando imóveis, em geral não-capsulados, podem apresentar-se como anaeróbios facultativos e produtores de biofilmes (DUARTE; SÁ, 2011). Essa bactéria é responsável por um vasto número de infecções em animais e em seres humanos, podendo provocar doenças que vão desde uma simples infecção (espinhas, foliculite, furúnculos) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, osteomielite, síndrome do choque tóxico, septicemia) (ELWARD *et al.*, 2009).

Essa bactéria produz uma grande variedade de exoproteínas, cuja função primordial é obter a partir dos tecidos do hospedeiro os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano. Essas proteínas, secretadas pela grande maioria das cepas de *S. aureus*, são um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas: alfa, beta, gama e delta (SANTOS *et al.*, 2007).

A deltatoxina ( $\delta$ -toxina) é capaz de inibir a absorção de água pelo íleo, devido à alteração do mecanismo de ação do monofosfato de adenosina cíclico (AMP-c), desencadeando uma diarreia aguda (SANTOS *et al.*, 2007). Estruturalmente, a  $\delta$ -toxina exhibe, predominantemente, estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice em bicamadas fosfolipídicas e em ambientes que mimetizam membranas (BRAUNER *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1987; TAPPIN *et al.*, 1988; BLADON *et al.*, 1992; LOHNER *et al.*, 1999). Em solução aquosa, no entanto, esse peptídeo possui um conteúdo variável de  $\alpha$ -hélice, que é dependente da sua concentração (COLACICCO *et al.*, 1977; THIAUDIERE *et al.*, 1991; DHOPLE; NAGARAJ, 2005).

A alfatoxina ( $\alpha$ -HL) é secretada pela bactéria na forma de um monômero estável em água (BERUBE; WARDENBURG, 2013). Ao ser liberada no ambiente extracelular, essa proteína pode se agregar em solução ou se inserir nas membranas celulares do hospedeiro para se oligomerizar e formar um poro heptamérico transmembranar (GOUAUX *et al.*, 1994), que aumenta a permeabilidade da membrana, o que possibilita o vazamento de eletrólitos (GU *et al.*, 1999; NOSKOV *et al.*, 2004).

O poro heptamérico de  $\alpha$ -HL é formado por três diferentes domínios: extramembranar, intramembranar e o anelar. O primeiro, convencionalmente denominado lado “cis”, possui uma entrada de aproximadamente 4,6 nm, o que possibilita a ampla passagem de macromoléculas. Esse domínio é rico em  $\alpha$ -hélices e em  $\beta$ -folhas, formando uma grande estrutura na face externa da membrana, semelhante a copa de uma árvore. Por outro lado, o domínio intramembranar, denominado lado “trans”, composto por 14 folhas organizadas em  $\beta$ -barril, e que é completamente inserido na bicamada lipídica. Esse domínio apresenta uma entrada de diâmetro menor, de cerca de 2 nm (SONG *et al.*, 1996) próximo a face interna da membrana. Finalmente, o domínio anelar fica localizado na interface entre os domínios “cis” e “trans”, sendo formado por anéis de resíduos ácidos e básicos.

A atividade hemolítica da  $\alpha$ -HL varia de acordo com a espécie de mamífero infectado, sendo bastante elevada em eritrócitos de coelho (BHAKDI *et al.*, 1984). Em humanos, essa proteína também parece exercer um papel importante na patogenicidade da bactéria, uma vez que pacientes infectados por *S. aureus* desenvolvem anticorpos de forma específica e proporcional à expressão da  $\alpha$ -HL (KOLATA *et al.*, 2011; ADHIKARI *et al.*, 2012; FRITZ *et al.*, 2013).

Recentemente, estudos sobre novos compostos, tendo como alvo a  $\alpha$ -HL, vem surgindo na literatura (DAI *et al.*, 2013; DONG *et al.*, 2013; QIU *et al.*, 2013), principalmente direcionados na inibição da sua oligomerização em membranas, e bloqueio do seu poro. Isso

se deve, entre outros fatores, à resistência de *S. aureus* a uma grande diversidade de antibióticos.

As bases de Schiff são compostos orgânicos que apresentam pelo menos um grupo  $R_2C=N-R$ , em que R corresponde a um átomo de hidrogênio ou a um radical aril, formadas a partir da condensação de uma amina primária com um grupo carbonilo (MCNAUGHT; WILKINSON, 1997). Tais compostos vêm sendo estudados para coordenação com metais pesados, através do referido grupo imínico (QIN *et al.*, 2013). Por outro lado, uma característica importante destes compostos é a formação de complexos estáveis com diversos metais de transição em vários estágios de oxidação (PSOMAS *et al.*, 2006; ROMERA, 2007). Estas ligações também apresentam uma grande eficiência em controlar o desempenho dos metais em várias transformações catalíticas (COZZI, 2004). As bases de Schiff são importantes intermediários nas sínteses de compostos bioativos. Sabe-se também que esses compostos têm apresentado significativos resultados em testes de atividade biológica, tais como antifúngica (JARRAHPOUR *et al.*, 2004), antimicrobiana ou antibacteriana (EL-MASRY *et al.*, 2000; ÜNVERA *et al.*, 2005) e antitumoral (POPP, 1964; ROMERA, 2007).

A propriedade antifúngica e antibacteriana de uma gama de Complexos de Cobre (II) foi avaliada contra vários fungos e bactérias patogênicas (ZORODDU *et al.*, 1996). Por esta importância nos processos biológicos, os Complexos de cobre (II) e as pesquisas sobre a atividade biológica têm sido o foco de diferentes perspectivas (ROMERA, 2007; KAT KAR *et al.*, 2014).

Considerando a necessidade de novos alvos terapêuticos para o tratamento de infecções hospitalares e na comunidade, causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar a ação de compostos de cobre – relacionados a base de Schiff na inibição da formação ou bloqueio de poros de  $\alpha$ -HL produzidos pelo *S. aureus*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral:*

Identificar compostos de cobre – relacionados a base de Schiff com potencial para bloquear poros da  $\alpha$ -HL de *S. aureus*, bem como analisar o estado conformacional da  $\delta$ -toxina, desta bactéria, em solução aquosa.

### 2.2 *Objetivos Específicos:*

- 2.2.1. Avaliar complexos de cobre – relacionados a base de Schiff potencialmente bloqueadores de canais de  $\alpha$ -HL de *S. aureus*, através de técnicas eletrofisiológicas.
- 2.2.2. Elucidar o mecanismo molecular do bloqueio do canal da  $\alpha$ -HL de *S. aureus* por complexos de cobre – relacionados a base de Schiff, pela utilização de *docking* molecular.
- 2.2.3. Avaliar o estado conformacional da  $\delta$ -toxina de *Staphylococcus aureus* em solução aquosa pela utilização de simulações por dinâmica molecular.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Staphylococcus aureus*

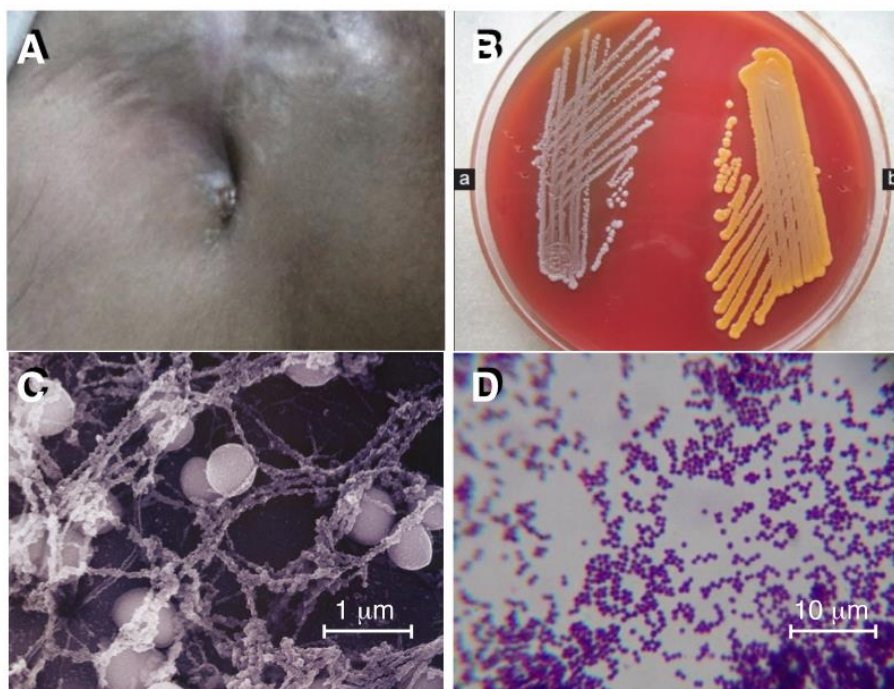
*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma bactéria aeróbia ou anaeróbia facultativa, Gram-positiva e esférica (**Figura 1C**) (ELWARD *et al.*, 2009), cujo crescimento ocorre de forma semelhante a cachos de uva (**Figura 1D**) (NAZARI *et al.*, 2015). São microorganismos com aproximadamente 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, imóveis, produtores de biofilme e que, em geral, são não-esporulados e não-encapsulados (DUARTE; SÁ, 2011).

A descoberta dessa bactéria foi creditada ao cirurgião escocês Sir Alexander Ogston, que descreveu a sua existência em 1880, após a análise de pus de abscessos cirúrgicos (ELWARD *et al.*, 2009). Segundo os testes de identificação bacteriana, o *S. aureus* são coagulase positivos,  $\beta$ -hemolíticos, maltose e manitol positivos e formadores de colônias pigmentadas (**Figura 1B**) (DUARTE; SÁ, 2011). Essas bactérias são encontradas como comensais em humanos, oferecendo poucos riscos de infecção em indivíduos saudáveis, sendo encontradas, por exemplo, na pele e na garganta (NAZARI *et al.*, 2015).

Por outro lado, como um patógeno, e especialmente devido ao surgimento e aumento na prevalência de cepas resistentes a meticilina (conhecidas do inglês como *methicillin-resistant S. aureus* – MRSA), essa espécie é uma das principais causadoras de infecções hospitalares ao redor do mundo (TRISTAN *et al.*, 2007).

Essa bactéria produz uma grande variedade de exoproteínas, cuja função primordial é de converter tecidos do hospedeiro nos nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (**Tabela 1**). Dessa forma, tais proteínas contribuem para a colonização da bactéria e para o aparecimento de uma grande diversidade de doenças em hospedeiros mamíferos (DINGES *et al.*, 2000).





**Figura 1:** (A) Abscesso causado por infecção por *Staphylococcus aureus*; (B) cultura de *Staphylococcus aureus* em meio ágar sangue mostrando em (b) a coloração dourada, de onde origina o nome da espécie; (C) fotografia de *Staphylococcus aureus* em microscopia de varredura; (D) coloração de Gram, mostrando a tonalidade roxa e sua característica Gram positiva. Adaptado de (RIT, 2014)

Nesse contexto, essa ampla variedade de enfermidades refletem a capacidade desse microorganismo em escapar do sistema imune inato e adaptativo, também pela secreção de vários fatores de virulência (TRISTAN *et al.*, 2007). Essas proteínas, secretadas pela grande maioria das cepas de *S. aureus*, são um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (denominadas alfa, beta, gama e delta), bem como nucleases, proteases, lipases, hialuronidases, collagenases, adesinas e coagulases (DINGES *et al.*, 2000).

No que diz respeito às hemolisinas, a atividade hemolítica da betatoxina ( $\beta$ -toxina) é atribuída à degradação enzimática de esfingolipídeos de membrana. Por sua vez, a  $\alpha$ -HL e a gamatoxina ( $\gamma$ -toxina) se oligomerizam em poros com formato de beta-barris nas membranas celulares do hospedeiro (DINGES *et al.*, 2000). Por outro lado, a respeito do mecanismo de

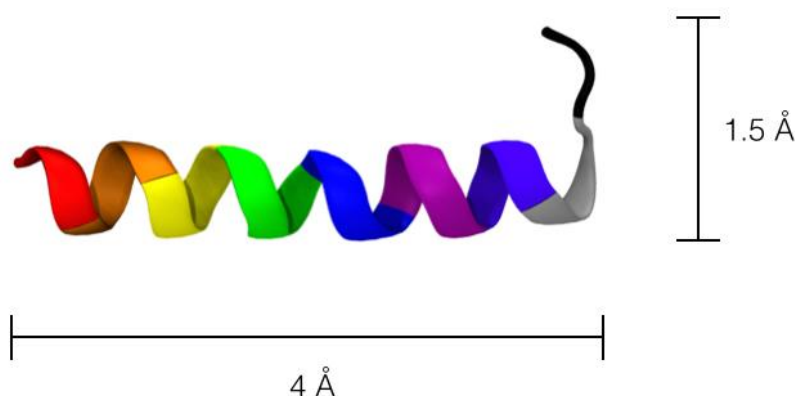
ação da  $\delta$ -toxina, dois tipos diferentes de eventos têm sido propostos, nos quais o peptídeo apresenta ações diferentes em função da sua concentração (VERDON *et al.*, 2009).

Tabela 1: Toxinas produzidas pelo *S. aureus* que participam dos mecanismos de patogenicidade e de resistência a esse patógeno. Adaptado de (SANTOS *et al.*, 2007)

| Nome                                         | Função                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ -HL                                 | Possui a propriedade de formar canais iônicos em membranas biológicas, sendo capazes de lisar hemácias e causar danos às plaquetas em casos de intoxicações graves.                                                                                                                                                                                           |
| $\beta$ -toxina                              | Degrada a esfigomielina, provocando lesões na membrana dos eritrócitos e, conseqüentemente, conduzindo à hemólise.                                                                                                                                                                                                                                            |
| $\delta$ -toxina                             | Possui propriedades tensoativas, atuando como detergente e sendo responsável pelos efeitos sobre as membranas de eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas. É capaz, ainda, de inibir a absorção de água pelo íleo, devido à alteração do mecanismo de ação do monofosfato de adenosina cíclico (AMP-c), desencadeando uma diarreia aguda. |
| $\gamma$ -toxina                             | Insere-se em membranas biológicas, causando extravasamento de conteúdo citoplasmático e lise celular.                                                                                                                                                                                                                                                         |
| PVL (leucocidina Panton-Valentine)           | Composta por dois componentes protéicos (S e F), que atuam sinergisticamente. Essa proteína altera a permeabilidade da membrana e ataca os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos. Essa alteração permite a entrada de cátions, como o $\text{Ca}^{+2}$ , resultando na degranulação celular e induzindo a citólise.                                   |
| Esfoliatina                                  | Promove a clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas (síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso).                                                                                                                                                                                                                     |
| TSST-1 (toxina da síndrome do choque tóxico) | Provoca febre, choque e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos, incluindo erupção cutânea descamativa ( <b>Figura 1A</b> ).                                                                                                                                                                                                                             |
| Enterotoxinas (A, B, C, D e E)               | Toxinas protéicas pirogênicas, termoestáveis, responsáveis pela intoxicação alimentar, podendo provocar vômitos e diarreias.                                                                                                                                                                                                                                  |

### 3.1.1 Deltatoxina

A  $\delta$ -toxina (**Figura 2**) é um peptídeo de 26 aminoácidos (KREGER *et al.*, 1971; DHOPLE; NAGARAJ, 2005).



**Figura 2:** Estrutura tridimensional da  $\delta$ -toxina de *Staphylococcus aureus*. As dimensões da proteína estão representadas pelas linhas verticais e horizontais. **PDB código 1DTC**

Ela lisa e rompe protoplastos bacterianos, esferoplastos, lisossomos e esférulas lipídicas (KREGER *et al.*, 1971). Da mesma forma, é ativa contra uma ampla diversidade de tipos celulares de mamíferos, atuando sobre as membranas de eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas, e é capaz de lisar estruturas subcelulares, como organelas associadas à membrana (VERDON *et al.*, 2009).

É capaz também de inibir a absorção de água pelo íleo, devido à alteração do mecanismo de ação do monofosfato de adenosina cíclico (AMP-c), desencadeando uma diarreia aguda (SANTOS *et al.*, 2007). Estruturalmente, a  $\delta$ -toxina exhibe predominantemente estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice em bicamadas fosfolipídicas e em ambientes que mimetizam membranas (BRAUNER *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1987; TAPPIN *et al.*, 1988; BLADON *et al.*, 1992; LOHNER *et al.*, 1999).

Em solução aquosa, no entanto, esse peptídeo possui um conteúdo variável de  $\alpha$ -hélice, que é dependente da sua concentração (COLACICCO *et al.*, 1977; THIAUDIERE *et al.*, 1991; DHOPE; NAGARAJ, 2005).

Sabe-se de dois possíveis mecanismos de ação para esse peptídeo, no qual ele pode atuar como um surfactante para permeabilizar e romper a membrana celular, quando em baixas concentrações (BERNHEIMER, 1974; BECHINGER; LOHNER, 2006), ou assumir a

conformação de um poro transmembranar, quando em concentrações maiores (MELLOR *et al.*, 1988; RAGHUNATHAN *et al.*, 1990; TALBOT *et al.*, 2001; POKORNY *et al.*, 2002).

Em contrapartida, como comentado acima, outras duas hemolisinas secretadas por *S. aureus* são formadoras de poro em membranas, e são mais bem caracterizadas no que diz respeito à adesão e inserção na membrana, dentre as quais a mais importante é a  $\alpha$ -HL.

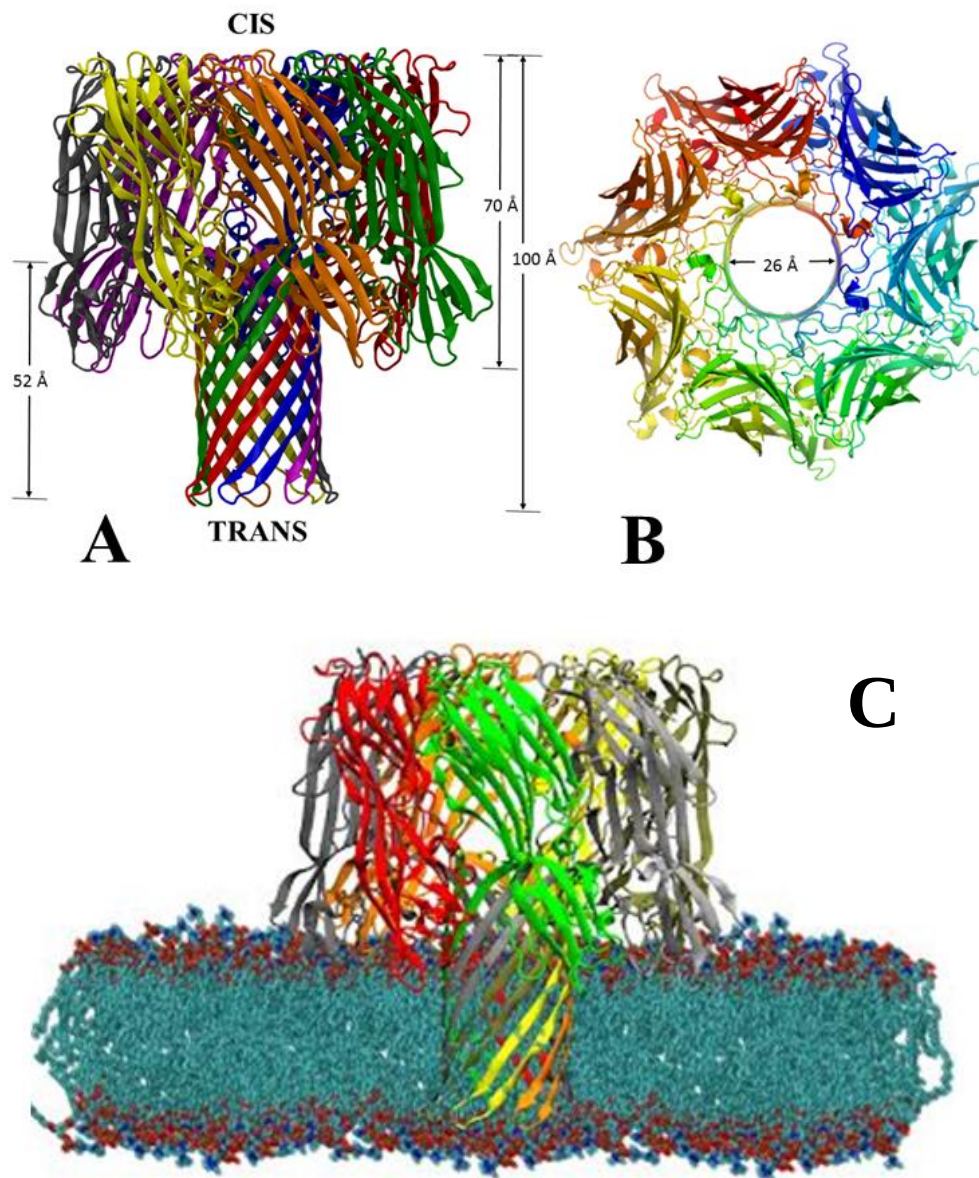
### 3.1.2 *Alfatoxina*

A  $\alpha$ -HL, conhecida como  $\alpha$ -hemolisina,  $\alpha$ -lisina ou  $\alpha$ -toxina, é uma proteína de 33 kDa secretada na fase final de crescimento exponencial da maioria das cepas de *S. aureus* na forma de um monômero de polipeptídeo contendo 293 aminoácidos solúvel em água (BERUBE; WARDENBURG, 2013).

Essa proteína pode se agregar em solução, ou se inserir nas membranas do hospedeiro para se oligomerizar e formar um poro heptamérico transmembranar (GOUAUX *et al.*, 1994) (**Figura 3**), levando ao extravasamento de conteúdo celular (GU *et al.*, 1999; NOSKOV *et al.*, 2004).

Várias evidências indicam que o mecanismo molecular com o qual a toxina se liga à superfície de membranas não é dependente de receptor proteico (VALEVA *et al.*, 2006). Nesse sentido, clusters de fosfatidilcolina aliados a presença de esfingolipídeos e colesterol na membrana parecem contribuir para a ligação de  $\alpha$ -HL com membranas biológicas (VALEVA *et al.*, 2006).

Por outro lado, a proteína de membrana ADAM10, uma metaloprotease dependente de zinco, foi indicada como receptor candidato para  $\alpha$ -HL (WILKE; WARDENBURG, 2010), o que sugere uma provável cooperatividade para adesão de  $\alpha$ -HL envolvendo tal receptor proteico e o ambiente na superfície da membrana.



**Figura 3:** Modelo do nanoporo formado pela  $\alpha$ -HL de *Staphylococcus aureus* com dimensões e topologia em relação à membrana (A) Vista lateral, (B) vista superior, (C) representação do nanoporo inserido na membrana lipídica. **PDB código 7AHL**

Embora essa toxina tenha sido descrita pela primeira vez na década de 30 (SMITH; PRICE, 1938), sua capacidade de formar canais em bicamadas lipídicas planas foi relatada somente em 1981 (KRASILNIKOV OV *et al.*, 1981), e o gene que a codifica, *hla*, foi clonado e sequenciado em 1984 (GRAY; KEHOE, 1984). Observou-se a partir dessa descoberta que

entre os 293 aminoácidos da proteína secretada pela bactéria, não há resíduos de cisteína (GRAY; KEHOE, 1984).

Estruturalmente, a toxina se organiza na forma de um poro heptamérico em  $\beta$ -barril, composto majoritariamente por  $\beta$ -folhas (cerca de 65%) e com aproximadamente 10% de elementos em  $\alpha$ -hélice, conforme já elucidado por cristalografia de raios-X (SONG *et al.*, 1996) e dicroísmo circular (TOBKES *et al.*, 1985). O posicionamento assimétrico e a geometria do poro em relação ao plano da membrana também já foram estudados em condições dinâmicas empregando não-eletrólitos (KRASILNIKOV *et al.*, 1988; MERZLYAK *et al.*, 1999).

O heptâmero de  $\alpha$ -HL é formado por três diferentes domínios: copal - ou extramembranar, troncular - ou intramembranar, e o anelar (SONG *et al.*, 1996). O primeiro, convencionalmente denominado lado “cis”, possui uma entrada de aproximadamente 4,6 nm, o que possibilita a ampla passagem de macromoléculas (SONG *et al.*, 1996). Esse domínio é rico em  $\alpha$ -hélices e em  $\beta$ -folhas, formando uma grande estrutura na face externa da membrana, semelhante a copa de uma árvore. Por outro lado, o domínio intramembranar, denominado lado “trans”, composto por 14 folhas organizadas em  $\beta$ -barril, e que é completamente inserido na bicamada lipídica, apresenta uma entrada de diâmetro menor, de cerca de 2 nm (SONG *et al.*, 1996) próximo a face interna da membrana (**Figura 3A**).

Na parte terminal do domínio “trans”, portanto nivelado com a face externa da membrana, e localizado na parte “interna” da proteína, há dois anéis compostos, respectivamente, de aminoácidos ácidos (resíduos de glutamato) e básicos (resíduos de lisina), separados por aminoácidos neutros (MERZLYAK *et al.*, 2005). Essa região, denominada de “constrição”, possui um diâmetro de apenas 1,4 nm (**Figura 3B**) e é o trecho limitante para o trânsito de macromoléculas pelo seu interior (MERZLYAK *et al.*, 1999; TEIXEIRA *et al.*,



2009), embora possibilite a passagem, por exemplo, de polietilenoglicol de até 2000 daltons (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Considerando que a formação desses poros resulta em uma perturbação significativa da integridade da membrana celular dos hospedeiros, o que leva eventualmente à morte celular (NESTOROVICH; BEZRUKOV, 2012), há um grande interesse biológico e terapêutico nessa proteína.

A atividade hemolítica da  $\alpha$ -HL varia de acordo com a espécie de mamífero infectado, sendo bastante elevada em eritrócitos de coelho (BHAKDI *et al.*, 1984) e ocorrendo também de forma dermonecrótica e neurotóxica. Em humanos, essa proteína também parece exercer um papel importante na patogenicidade da bactéria, uma vez que pacientes infectados por *S. aureus* desenvolvem anticorpos de forma específica e proporcional à expressão da  $\alpha$ -HL (KOLATA *et al.*, 2011; ADHIKARI *et al.*, 2012; FRITZ *et al.*, 2013).

Adicionalmente, cepas de grande virulência em indivíduos saudáveis expressam  $\alpha$ -HL (DELEO *et al.*, 2011), enquanto que existem mutações nos genes responsáveis pela expressão e controle da proteína em vários isolados de infecção hospitalar, que podem levar a uma menor secreção de  $\alpha$ -HL (DELEO *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que a expressão e secreção de  $\alpha$ -HL pela bactéria é necessária à patogênese da infecção por *S. aureus* em indivíduos saudáveis, porém pode ser de menor relevância em pacientes predispostos à invasão e infecção bacteriana em função de doenças associadas ou hospitalização (DELEO *et al.*, 2011). Tais hipóteses só poderão ser confirmadas, no entanto, à medida que estudos possam ser realizados com novos agentes terapêuticos direcionados a  $\alpha$ -HL, especialmente em cepas de infecção hospitalar e presentes na comunidade.

### 3.2 Resistência aos Antibióticos

Recentemente estudos sobre novos compostos, tendo como alvo a  $\alpha$ -HL, tem surgido na literatura (DAI *et al.*, 2013; DONG *et al.*, 2013; QIU *et al.*, 2013), principalmente direcionados na inibição da sua oligomerização em membranas. Isso se deve, entre outros fatores, a resistência de *S. aureus* a uma grande diversidade de antibióticos (**Tabela 2**). Os compostos  $\beta$ -lactâmicos, tais como a meticilina, a amoxilina e a ampicilina, podem ter sua atividade antibacteriana neutralizada, por exemplo, através da ação de uma enzima  $\beta$ -lactamase, que hidrolisa tais compostos a partir do núcleo  $\beta$ -lactâmico, através do produto do gene *blaZ*, transferido a cepas resistentes, e entre elas, através da *pili* dessas bactérias por meio de *transposons* (**Tabela 2**), que consistem em sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) capazes de se movimentar dentro de um genoma. Glicopeptídeos, tais como a vancomicina, podem ter sua atividade neutralizada por meio de mutações na proteína alvo da bactéria, ou através de mudanças em parte dos componentes da camada externa da bactéria (**Tabela 2**). A resistência a aminoglicosídeos, por sua vez, se dá através de modificações pós-traducionais em proteínas modificadoras desses agentes bioativos (**Tabela 2**), portanto modulando a atividade dessas enzimas e, assim, levar a um mais acelerado processamento e perda de atividade antibacteriana desses compostos.

Adicionalmente a isso, apesar do vasto desenvolvimento e aplicação de novos compostos ao tratamento de infecções por essa bactéria, o *S. aureus* tem demonstrado uma habilidade única de responder a novos tratamentos através do desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (PANTOSTI *et al.*, 2007).

Em uma perspectiva histórica, antes da descoberta e início do uso da penicilina, em 1940, a mortalidade de pacientes infectados com *S. aureus* era superior aos 80%. Apesar da grande melhora do prognóstico de pacientes com infecção estafilocócica após a introdução



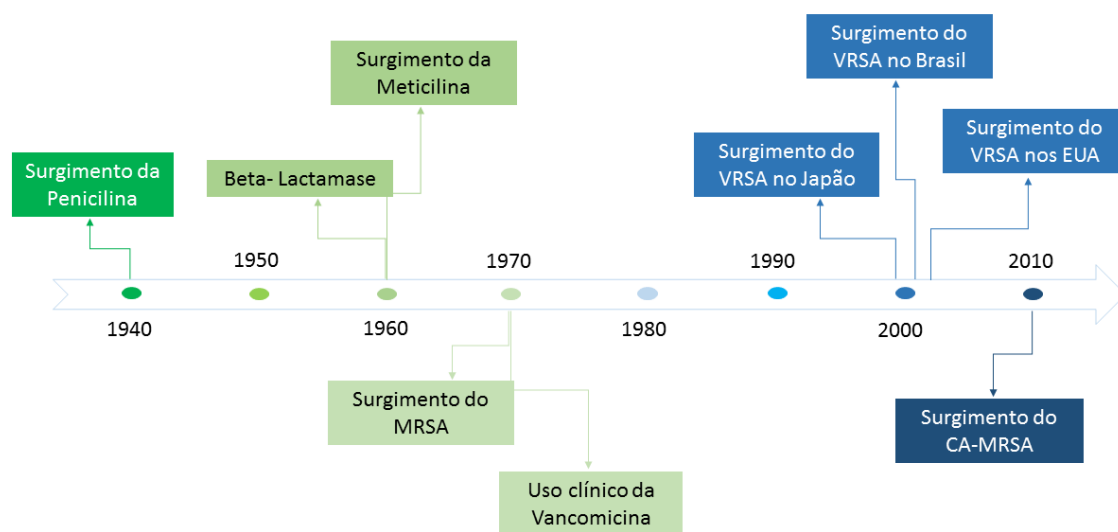
desse medicamento, já em 1942 cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina foram detectadas em hospitais (LOWY, 2003; APPELBAUM, 2007).

Após duas décadas, aproximadamente 80% dos isolados da bactéria, coletados em hospitais ou na comunidade, eram resistentes ao medicamento. Isso ocorreu devido à transmissão horizontal de DNA na forma de plasmídeos (NOVICK; BOUANCHAUD, 1971), que continham o gene *blaZ* que, por sua vez, codifica uma proteína da classe beta-lactamase A (PANTOSTI *et al.*, 2007). Essa enzima, que é expressa em altas concentrações mediante exposição da bactéria à penicilina ou algum composto estruturalmente semelhante, como a ampicilina, hidrolisa tais moléculas gerando um composto inativo. Se não bastasse isso, o plasmídeo que codifica essa enzima, também conhecida como penicilinase, carrega outros genes de resistência, incluindo compostos desinfetantes, corantes, metais pesados e outros antibióticos, como eritromicina e aminoglicosídeos (LYON; SKURRAY, 1987; MASSIDDA *et al.*, 2006).

Tabela 2: Mecanismos de resistência de *S. aureus* frente a alguns antibióticos. Adaptado de (LOWY, 2003)

| Antibiótico                         | Nome e localização do gene                | Produto gênico                               | Mecanismo de resistência                                            |
|-------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| β-lactâmicos                        | <i>blaZ</i> – plasmídeo ou transposon     | β-lactamase                                  | Hidrólise do composto                                               |
|                                     | <i>mecA</i> – cromossomo                  | Proteína PBP2a                               | Afinidade reduzida pelo composto                                    |
| Glicopeptídeos                      | Desconhecido (VISA) – cromossomo          | Peptidoglicana alterada                      | Vancomicina fica presa na parede celular                            |
|                                     | Desconhecido                              | D-Ala-D-Lac                                  | Gera mutações na região                                             |
| Quinolonas                          | <i>parC</i> – cromossomo                  | Proteína parte componente da topoisomerase 4 |                                                                     |
| Aminoglicosídeos (ex.: gentamicina) | Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos | Acetiltransferase, fosfotransferase          | Acetilando e/ou fosforilando enzimas que modificam aminoglicosídeos |

O primeiro composto antibiótico desenvolvido para tentar se sobrepôr a um mecanismo de resistência bacteriana foi a meticilina (**Figura 4**). No entanto, logo após a introdução da meticilina, em 1961, rapidamente foram relatadas cepas resistentes a esse medicamento. Ainda hoje, a maioria das cepas de *S. aureus* possuem resistência a drogas  $\beta$ -lactâmicas, como a penicilina e a meticilina, o que aumenta sua importância como patógeno humano, principalmente em ambiente hospitalar (RAJALAKSHMI *et al.*, 2014). Essa importância é tão significativa a ponto de que seja consenso que “nenhum marcador de resistência a antibióticos tem diferenciado uma espécie mais do que a resistência a meticilina o fez com *S. aureus*” (MULLIGAN *et al.*, 1993).



**Figura 4:** Surgimento de alguns antibióticos e cepas resistentes do *Staphylococcus aureus* nos Séculos XX e XXI. MRSA significa *S. aureus* resistentes à meticilina; VRSA significa *S. aureus* resistentes à vancomicina; CA-MRSA significa *S. aureus* resistentes à meticilina de origem comunitária. Adaptado de (SANTOS *et al.*, 2007)

### 3.3 Infecção e transmissão

Embora muitas dessas infecções ocorram em pacientes com antecedentes de internação hospitalar, um número crescente de casos tem surgido sem exposição anterior em hospitais. Ocorrendo tanto em ambientes rurais quanto urbanos, essas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) causam grande preocupação, devido a elevada mortalidade associada a elas (PANTOSTI *et al.*, 2007). Acredita-se que a escolha de medicamentos  $\beta$ -lactâmicos como terapia inicial para tratamento dessas infecções tenha contribuído para isso.

A transmissão dessas MRSA acontece majoritariamente através de contato com a pele de um paciente ou portador, mas pode ocorrer através de objetos, como maçanetas ou toalhas, tocados por essas pessoas. Recentemente, foi identificada também a transmissão pecuária de MRSA, ou seja, de animais para humanos (HARRISON *et al.*, 2013). Ainda, os cocos causam grandes problemas no setor alimentício por meio da contaminação de produtos alimentares (RAJALAKSHMI *et al.*, 2014).

O biofilme bacteriano consiste de um grupo de células bacterianas colonizando uma superfície ou um substrato com a ajuda de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS - *extracellular polymeric substances*), que, por sua vez, é constituída por macromoléculas como polissacarídeos, proteínas, substâncias húmicas e ácidos urônicos, coletivamente conhecidos como exopolissacarídeos ou substâncias poliméricas extracelulares (RAJALAKSHMI *et al.*, 2014). No caso de *S. aureus*, os biofilmes representam uma espécie de reservatório de disseminação da bactéria para outros tecidos do hospedeiro (OTTO, 2008). Do ponto de vista de patogênese molecular, não se sabe se as bactérias responsáveis pela formação de biofilmes são geneticamente diferentes daquelas envolvidas em infecções severas, ou se estão simplesmente em um status fisiológico alternativo e, portanto, podem

facilmente desenvolver um comportamento mais agressivo ao se disseminar pelo corpo (OTTO, 2008).

### **3.4 Estudo prospectivo de inibidores e bloqueadores de alfatoxina**

O rápido desenvolvimento de resistência a antibióticos por *S. aureus* e a prevalência e severidade das infecções causadas por essa bactéria tem feito surgir diversos estudos na literatura, em busca de novos compostos para uso no tratamento e prevenção das doenças associadas a essas infecções. Tal como já revisado previamente, uma série de compostos já foram identificados para tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, no entanto inúmeras cepas dessa bactéria se mostraram capazes de adquirir resistência a esses medicamentos (**Tabela 2**). Dentre esses compostos, vancomicina é o medicamento mais indicado para uso em casos de infecções severas por MRSA, no entanto, uma série de fatores limita sua eficácia, como uso prolongado, sua nefrotoxicidade e a prevalência crescente de cepas não susceptíveis (CHAMBERS; DELEO, 2009).

Embora vários antibióticos estejam, atualmente, em fase de testes clínicos (CHAMBERS; DELEO, 2009), a busca por alvos proteicos alternativos tem sido uma opção crescente nesse sentido. Essas buscas costumam estar relacionadas tanto a produtos gênicos envolvidos em funções essenciais da célula, tais como de processamento de nutrientes (OHLSEN; LORENZ, 2007), como a proteínas e enzimas com papel importante para a patogênese da bactéria, tais como lipases associadas a membrana externa (ÜNLÜ *et al.*, 2015). Por outro lado, vários esforços têm sido feitos também para a descoberta e disseminação de estratégias de imunização que tenham por alvo componentes da membrana externa de *S. aureus*, tais como adesinas associadas a membrana, ácidos teicóicos ou outros antígenos (OHLSEN; LORENZ, 2007).

### 3.4.1 O design de moléculas de interesse biológico

A prospecção e a projeção de moléculas de interesse biológico tem sido alvo extensivo de pesquisas nos campos da química bioinorgânica, bioquímica e farmacologia. Frequentemente são empregadas moléculas sintetizadas a partir de compostos orgânicos e/ou inorgânicos (YE *et al.*, 2008; XIE; BOGLIOTTI, 2014). Neste contexto, especialmente com o surgimento crescente de resistência a antibióticos, técnicas computacionais tais como o *de novo drug design* têm sido empregadas para sugerir novos arcabouços ou modificações em compostos já conhecidos (SCHNEIDER *et al.*, 2009; HARTENFELLER; SCHNEIDER, 2011).

Em várias situações, a complexação de íons metálicos a ligantes orgânicos tem sido relatada como capaz de melhorar as atividades biológicas de compostos (TAKEUCHI *et al.*, 1998; CERCHIARO *et al.*, 2004). Portanto, espera-se que um *design* adequado de ligantes, bem como a quelação com íons metálicos adequados, devam melhorar a eficácia biológica desses compostos (TAKEUCHI *et al.*, 1998; CERCHIARO *et al.*, 2004). Entre os vários ligantes orgânicos, benzimidazol (bzim), 1,10-fenantrolina (fen) e seus derivados têm aplicação potencial como antitumoral, anti-histamínico, anti-helmíntico, antiúlcera, antifúngico, e anti-hipertensivo (RAJALAKSHMI *et al.*, 2014).

Sabe-se também que complexos de fen associados a Cu (II) têm sido utilizados como agentes antimicrobianos (RAJALAKSHMI *et al.*, 2014).

## 3.5 Complexos de Cobre – Base de Schiff

Em 1864, Hugo Schiff descreveu que a condensação entre um aldeído e uma amina gerava uma base de Schiff (COZZI, 2004); (ROMERA, 2007). As bases de Schiff são

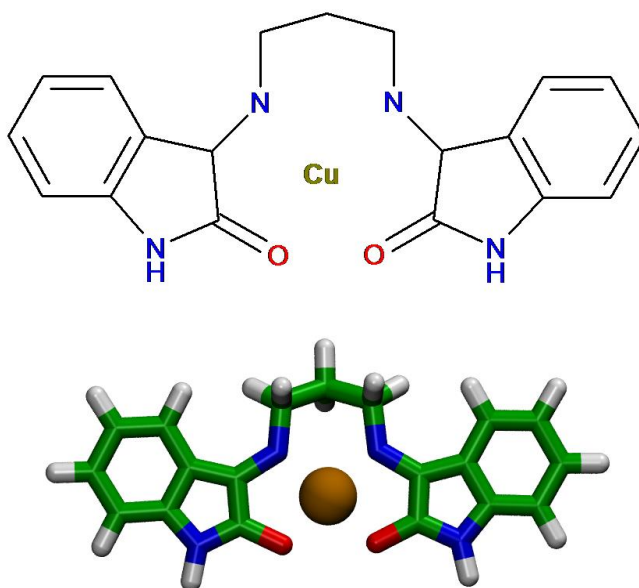
compostos que apresentam um grupo imina ( $R_2C=NR$ ) em sua estrutura (GAKIAS *et al.*, 2005). Os ligantes bases de Schiff são capazes de coordenar com íons metálicos pelo grupo imínico e por outro grupo, geralmente um aldeído (COZZI, 2004). Os sítios de ligação mais comumente encontrados são os átomos de nitrogênio e oxigênio, mas podemos encontrar átomos de enxofre como fonte de elétrons livres. Apresentam grande flexibilidade sintética, onde a combinação de aminas com aldeídos facilita a formação do *design* estrutural desejado, podendo-se obter diversas fórmulas estruturais.

Uma característica importante destes ligantes é a formação de complexos estáveis com diversos metais de transição em vários estágios de oxidação (PSOMAS *et al.*, 2006; ROMERA, 2007). Também apresentam uma grande eficiência em controlar o desempenho dos metais em várias transformações catalíticas (COZZI, 2004).

As bases de Schiff são importantes intermediários nas sínteses de compostos bioativos. Sabe-se também que esses compostos têm apresentado significativos resultados em testes de atividade biológica, tais como antifúngica (JARRAHPOUR *et al.*, 2004), antimicrobiana (EL-MASRY *et al.*, 2000; ÜNVERA *et al.*, 2005) e antitumoral (POPP, 1964; ROMERA, 2007).

O cobre é componente de várias enzimas, como a lisil oxidase, que catalisa a formação do colágeno e elastina; ceruloplasmina, que é essencial para absorção e transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina; e superóxido dismutase, que protege as células dos efeitos tóxicos no metabolismo do oxigênio (COUNCIL, 2001). Da mesma forma, é componente da citocromo-oxidase, enzima oxidase terminal na cadeia respiratória, que catalisa a redução de  $O_2$  para água, etapa essencial na respiração celular (MCDOWELL, 1992). Por estar envolvido no mecanismo de oxidação, sua deficiência leva a transtornos no metabolismo oxidativo, podendo manifestar-se de múltiplas formas (GONZÁLEZ; SILVA, 2003; KAT KAR *et al.*, 2014).

O papel biológico de cobre (II) (SORENSEN, 1989), e sua atividade sinérgica com drogas, têm sido objeto de um grande número de estudos químicos e farmacológicos (PSOMAS *et al.*, 2006). A propriedade antifúngica e antibacteriana de uma gama de Complexos de Cobre (II) foi avaliada contra vários fungos e bactérias patogênicos (ZORODDU *et al.*, 1996). Por esta importância nos processos biológicos, as pesquisas sobre as atividades biológicas dos Complexos de cobre (II) (**Figura 5**) têm sido o foco em diferentes perspectivas (ROMERA, 2007; KAT KAR *et al.*, 2014).



**Figura 5:** Ilustração do Composto Cu(Isapn). Em cima uma representação 2D e em baixo a representação 3D

Recentemente, uma série de complexos de cobre – base de Schiff e compostos relacionados foram estudados por técnicas *ab-initio* computacionais de DFT (do inglês *density functional theory*), dentre as quais estava o composto Cu(Isapn) (CARAMORI *et al.*, 2012). Várias destas moléculas foram sintetizadas e testadas para uma ampla gama de atividades

biológicas, antes e depois do referido estudo computacional (SILVEIRA *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2013; NUNES *et al.*, 2015).

Neste trabalho, investigou-se a atividade do composto Cu(Isapn) na inibição e bloqueio dos canais iônicos formados pela  $\alpha$ -HL, uma vez que esta toxina é um importantíssimo fator de virulência da bactéria *Staphylococcus aureus*.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Ensaio da atividade hemolítica da alfatoxina

O ensaio de atividade hemolítica seguiu um procedimento padrão (KRASILNIKOV *et al.*, 1997). Inicialmente foi obtida uma suspensão de eritrócitos, por adição de 1 ml de sangue fresco a 20 volumes da solução fisiológica padrão isotônica (SP): 150 mM de NaCl, 5 mM de Tris-citrato, EDTA 1%, pH 7.5. Os eritrócitos de coelho foram obtidos por centrifugação da amostra de sangue em 1000 r.p.m., por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos sedimentados foram lavados três vezes com a SP. O hematócrito da suspensão foi medido após centrifugação (centrífuga - modelo 210 I.E.C., FANEM, São Paulo, SP, Brasil). A suspensão final dos eritrócitos foi ajustada para 2%.

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado para avaliar a proteção dos eritrócitos de coelho à ação da  $\alpha$ -HL na presença dos complexos de cobre. A extensão da lise foi determinada pela medida direta da absorbância da suspensão das células em um comprimento de onda 655 nm a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  usando um leitor de placa Bio-Rad (modelo 170-6638, CA, EUA). Neste comprimento de onda a hemólise causa uma diminuição na absorbância. Todas as substâncias foram dissolvidas na SP. O experimento foi iniciado pela adição de 50  $\mu\text{l}$  de uma suspensão de 2% de eritrócitos de coelho em cada poço da placa que rapidamente foram incubados com as diferentes diluições dos inibidores e posteriormente foi adicionada a solução contendo  $\alpha$ -HL. A concentração final de eritrócitos foi de 1% e o volume final em cada poço da microplaca foi de 100  $\mu\text{L}$ . Uma pipeta muticanal foi usada para a iniciação simultânea do ensaio e a primeira leitura da absorbância foi tomada imediatamente. Os poços que continham somente a suspensão dos eritrócitos de 1% no SP foram usados para um ensaio negativo do controle (hemólise de 0%).

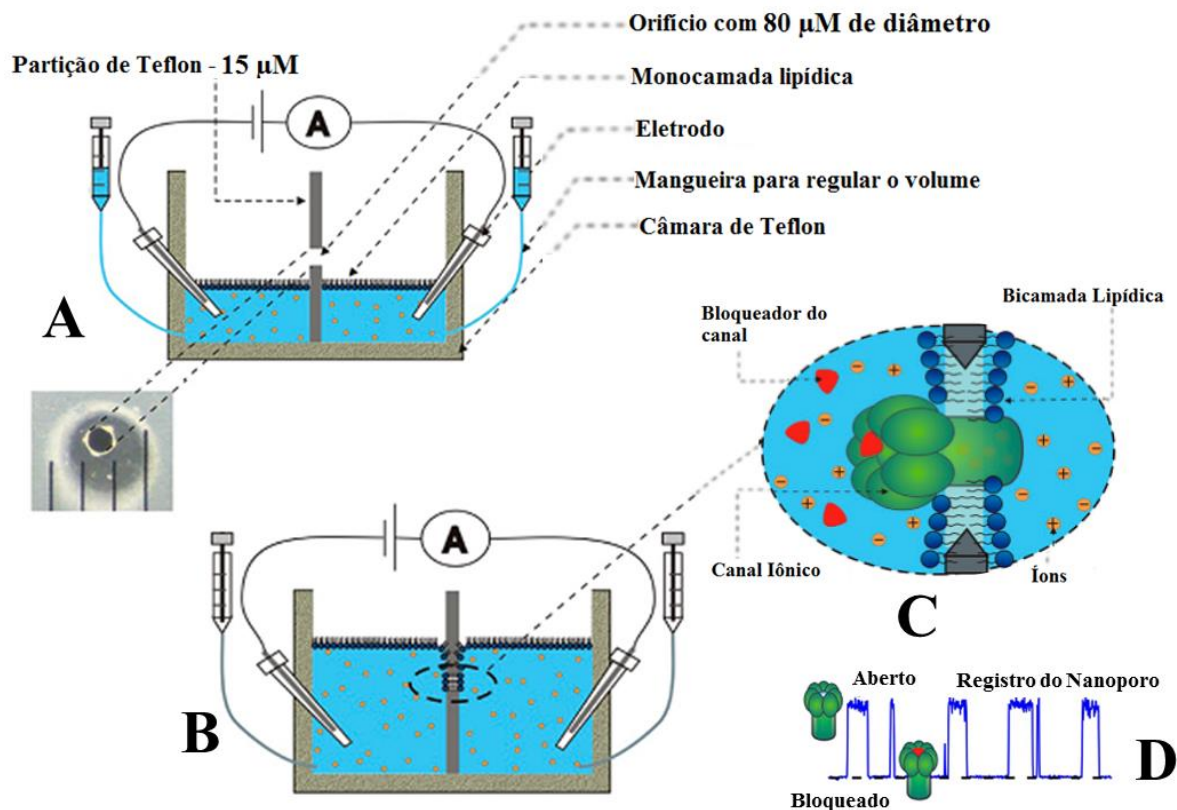
A absorbância dos poços com os eritrócitos lisados com 2% Triton X-100 foi considerada como controle positivo (hemólise 100%). A absorbância foi medida repetidamente em todos os poços em intervalos de tempo de 5 minutos. Esses ensaios foram realizados em triplicatas para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

#### 4.2 Construção das membranas artificiais

Para a formação da bicamada lipídica plana, utilizou-se a técnica de Montal e Mueller (1972). A técnica consiste na formação da bicamada pela aposição de duas monocamadas lipídicas em um orifício contido em uma película de Teflon<sup>®</sup> (politetrafluoretileno), denominada “partição”. A partição possui aproximadamente 25 µm de espessura e um orifício de aproximadamente 80 µm. Ela é fixada no meio da câmara experimental também de Teflon<sup>®</sup>, usando como impermeabilizante uma fina camada de graxa de silicone para alto vácuo e dividindo-a, em duas hemicâmaras (*cis/trans*). As hemicâmaras são mantidas unidas através de um suporte metálico. Uma vez montada a câmara, adiciona-se 1 mL de solução eletrolítica, em cada compartimento da câmara. Em seguida, são adicionados 10 µL da solução do lipídeo sintético de diftanoilfosfatidilcolina (DPhPC) (0,5%, m/v) em cada compartimento, e, após 2 a 3 minutos, o orifício foi tratado com solução de 1% de hexadecano em hexano (**Figura 6 A**). Após um período de 10-15 min, tempo necessário para evaporação do solvente, o nível líquido do compartimento *trans* é elevado por adição de mais 1 mL da solução salina, formando a primeira monocamada, para em seguida elevar o lado oposto e completar a formação da bicamada (**Figura 6 B**).

Com a membrana assim formada, adicionou-se a proteína  $\alpha$ -HL ao compartimento *cis* em concentração suficiente para a formação de um único canal iônico (**Figura 6 C**). Após a inserção do canal, uma corrente iônica flui através dele incorporado na membrana formada no

interior do orifício da partição de Teflon<sup>®</sup> que se encontra banhada por solução salina de KCl 4M, Tris 5 mM e pH 7,5 ajustado com ácido cítrico.

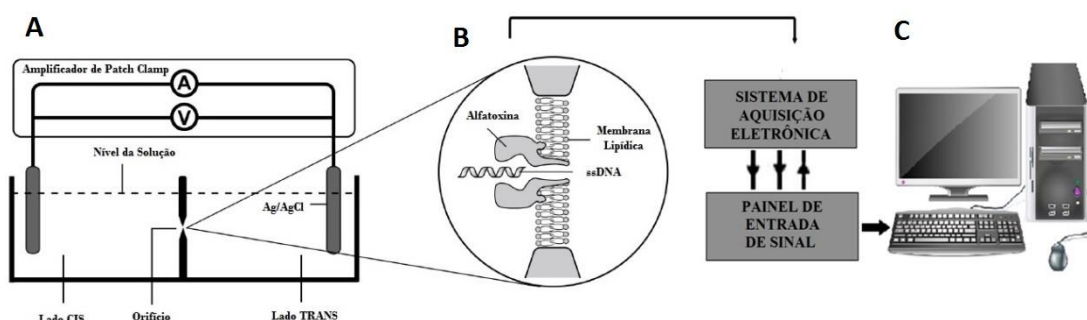


**Figura 6:** Esquema da montagem experimental para os estudos com canal unitário. (A) Desenho da câmara experimental formada por duas hemicâmaras separadas por uma película de Teflon<sup>®</sup> com um orifício (aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  de diâmetro) para a formação da bicamada lipídica plana. (B) Montagem das duas monocamadas lipídicas. A deposição de cada uma das monocamadas lipídicas ocorre com a introdução de mais solução em cada um dos respectivos compartimentos da câmara. (C) A membrana lipídica com um único nanoporo inserido. (D) Modelo da passagem de corrente iônica através do nanoporo. Adaptado de (NESTOROVICH; BEZRUKOV, 2012)

#### 4.3 Sistema eletrônico de aquisição e registro da corrente iônica

O sistema experimental utilizado para estimulação, monitoração e aquisição dos registros de corrente iônica através dos canais foi constituído de um amplificador de patch clamp Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA), um filtro passa-baixa Bessel

(Model 902, Frequency Devices, Haverhill, MA), um conversor analógico-digital Digidata 1440 (Axon Instruments, Foster City, CA) acoplador a um microcomputador IBM PC compatível. A conexão dos compartimentos da câmara ao sistema de aquisição de sinais biológicos foi feita através de pontes salinas do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl).



**Figura 7:** Sistema de aquisição eletrônica dos registros de corrente iônica. A) Modelo da câmara de Teflon. B) Canal de  $\alpha$ -HL incorporado na bicamada lipídica. (C) Diagrama da interface eletrônica de aquisição dos registros de corrente. **Adaptado de (STEFUREAC, 2012)**

#### 4.4 A síntese dos complexos de cobre(II)-base de Schiff derivados da Isatina

Os seguintes complexos de cobre(II) base de Isatin-Schiff foram sintetizados: perclorato de Cu(isapn)  $[\text{Cu-isapn}(\text{ClO}_4)_2]$ , 594.8 g/mol, e sulfonato de Cu(isapn)  $[\text{Cu-isapn}(\text{SO}_4)_2]$ , com 654.48 g/mol, e gentilmente cedidos pela Doutora Ana Maria da Costa Ferreira do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Segundo suas características físico-químicas, as bases de Schiff constituem uma classe de compostos orgânicos do grupo imina, formadas pela condensação de um grupo amina primária de uma molécula com um grupo aldeído ou cetona de outro grupo químico. As iminas formam muito facilmente complexos de coordenação estável com a maioria dos metais de transição reagindo e sendo isoladas do meio reacional sem muitas dificuldades. A estabilidade térmica associada

à facilidade de formar complexos metálicos possibilita a utilização destes compostos em diversos estudos. Estes fatores favoreceram esta classe de ligantes para a síntese de complexos de cobre II. A isatina (1H-indol-2,3-diona) é um derivado do indol que foi obtido primeiramente como um produto da oxidação do corante índigo pelos ácidos nítrico e crômico. Ligantes derivados de isatina são um versátil material de partida para síntese orgânica na construção de compostos heterocíclicos e precursores de fármacos. A isatina apresenta um interessante equilíbrio ceto-enólico dando origem a complexos catiônicos e neutros, com várias formas estruturais e diferentes reatividade (SILVA *et al.*, 2001; NTZIACHRISTOS *et al.*, 2007).

Os complexos foram dissolvidos em uma mistura de água e DMSO (1:10 v/v) em uma concentração de 5 mM (solução estoque). Essas soluções foram então filtradas em membrana (Millipore) de 0,22 µm, divididas em alíquotas de 1 ml em tubos estéreis e estocadas a 20 °C. Além dos compostos, foi preparada uma solução estoque do veículo (10% DMSO). Os compostos foram testados em experimentos com canais de  $\alpha$ -HL em bicamadas lipídicas planas e nos ensaios hemolíticos.

#### **4.5 Análise experimental da interação dos compostos de cobre com o canal da alfatoxina**

A condutância de um único canal, determinada em potenciais de -200 à +200 mV, (em incrementos de 20 mV), foi utilizada para construção das curvas condutância-voltagem (G-V) nas condições: (i) controle; e (ii) teste, na presença dos complexos de cobre, adicionados no compartimento *cis* da câmara. Utilizando o programa TauHist (desenvolvido por Dr. M.A. Pustovoi; Petersburg, Nuclear Physics Institute, Gatchina, Russia) ou o PClamp 10.4 (Axon Instruments, Foster City, CA), foi realizada a análise cinética convencional dos registros

temporais de corrente iônica, determinando o tempo de permanência do canal em cada um dos estados aberto ou bloqueado por um dos complexos de cobre (COLQUHOUN; SIGWORTH, 1995). Os dois parâmetros da cinética de interação das moléculas unitárias com o nanoporo são denominadas como:  $\tau_{on}$  e  $\tau_{off}$ , que representam o tempo da permanência do poro no estado desocupado e ocupado, respectivamente. Estes parâmetros foram obtidos através da análise da distribuição de no mínimo um milhão de transições entre os estados. Através desses parâmetros primários, foi possível calcular as constantes da velocidade de entrada ( $k_{on} = 1/(\tau_{on} \times C)$ ) e saída das moléculas ( $k_{off} = 1/\tau_{off}$ ) e, claro, a constante de equilíbrio ( $K_d = k_{on} / k_{off}$ ) e o valor das suas energias de interação com o sítio no interior do poro ( $\Delta G^{app} \sim kT \ln K^{app}$ ) (RODRIGUES *et al.*, 2008).

#### **4.6 Análise teórica da interação dos compostos de cobre com o canal da alfatoxina.**

A estrutura da  $\alpha$ -HL utilizada para os estudos de docking molecular rígido foi retirada do *Protein Data Bank* (PDB), sob código 7AHL (SONG *et al.*, 1996). Os dockings foram realizados com os programas DockThor (MAGALHÃES *et al.*, 2014) e AutoDock 4.2 (MORRIS *et al.*, 2009), sendo esse último associado ao programa AutoDock Tools (MORRIS *et al.*, 2009). O estado de protonação dos resíduos da proteína foi assinalado para pH 7,4. Em ambos os programas, para a análise dos resultados, foi utilizado um RMSD (do inglês *Root mean square deviation*) de 2Å, separando os *clusters* em função da energia de interação proteína-ligante.

Os programas empregados nos estudos de docking utilizam o algoritmo genético e o algoritmo genético Lamarckiano na geração de poses dos compostos na superfície da proteína de interesse. O algoritmo genético se baseia no modelo de evolução proposto por Charles Darwin, nas quais os indivíduos mais adaptados são escolhidos para gerar novos indivíduos

(WELLOCK; ROSS, 2001). Nesse algoritmo, uma população de orientações dos compostos é criada randomicamente, e seus membros são possíveis soluções do problema. Dessa forma, tais poses são analisadas quanto à adaptação, ao que se dá o termo técnico de *fitness*. Quanto maior for o *fitness*, mais adaptado será aquela conformação, e maior será a chance dessa pose em solucionar o problema. O algoritmo genético Lamarckiano, por sua vez, utiliza o mesmo princípio descrito acima, porém com a adição da ideia de Lamarck, nas quais as mudanças sofridas para adaptação são passadas para as próximas gerações, como um instrumento de aperfeiçoamento do método e otimização dos resultados (WELLOCK; ROSS, 2001). Assim, as modificações geradas no ligante, objetivando melhorar o encaixe no receptor, serão permanentes e poderão ser passadas para os novos indivíduos. Em seguida, as poses serão usadas para gerar outras através de operadores denominados *crossover*, mutação e reprodução. No *crossover*, dois ou mais membros da população são combinados a fim de criar um novo. Na mutação, uma modificação em alguma parte do indivíduo é gerada, introduzindo novas potenciais soluções. Na reprodução, uma cópia do indivíduo é inserida na população, prevenindo sua perda. Portanto, em um cálculo de *docking* molecular, será criada uma população do ligante cujos membros serão testados por *fitness*. Os mais adaptados, ou seja, os que possuem melhor ligação com o receptor, serão modelos para gerar novos indivíduos através dos operadores descritos acima com a finalidade de obter melhores resultados.

Para os estudos com DockThor, os parâmetros de docking padrão da plataforma *online* foram utilizados, uma vez que tais valores serviram para otimização do programa. Especificamente, foi empregado o algoritmo genético com um número máximo de 1.000.000 de avaliações, com um tamanho de população de 1000, e em um total de 30 rodadas.

Para os estudos com AutoDock, esquema de cargas Gasteiger foi utilizado para os átomos da proteína e do ligante. O mapa de *grid* foi calculado utilizando o programa AutoGrid (MORRIS *et al.*, 2009), na qual 129 x 129 x 129 pontos foram utilizados com

espaçamento de 0.375 Å, e centralizado no domínio anelar da  $\alpha$ -HL. O algoritmo genético Lamarckiano foi empregado, em um total de 200 rodadas, cada um com uma população de 150 indivíduos, com um número máximo de 25.000.000 de avaliações de energia, e um número máximo de 27.000 gerações.



## 5. RESULTADOS

**5.1** Artigo “*INHIBITION OF THE HEMOLYTIC ACTIVITY CAUSED BY STAPHYLOCOCCUS AUREUS ALPHA-HEMOLYSIN THROUGH ISATIN-SCHIFF COPPER(II) COMPLEXES*”, publicado na revista **FEMS Microbiology Letters**



FEMS Microbiology Letters, 363, 2016, fnv207

doi: 10.1093/femsle/fnv207

Advance Access Publication Date: 30 October 2015

Research Letter

## RESEARCH LETTER – Pathogens & Pathogenicity

# Inhibition of the hemolytic activity caused by *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin through isatin-Schiff copper(II) complexes

Maria C. A. Melo<sup>1</sup>, Luciana R. Teixeira<sup>1</sup>, Laercio Pol-Fachin<sup>2,3</sup> and Claudio G. Rodrigues<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Membrane Biophysics and Stem Cell Dr. Oleg Krasilnikov, Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, <sup>2</sup>Biomaterials Laboratory, Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil and <sup>3</sup>Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

\*Corresponding author: Avenida Professor Moraes Rego, 1234, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Recife, Pernambuco, Brazil 50670901.

Tel: +55 81 21268535; Fax: +55 81 21268560; E-mail: [cgrufpe@gmail.com](mailto:cgrufpe@gmail.com)

One sentence summary: Copper compounds can be used as therapeutic agents for the treatment of the bacterial infections.

Editor: Jan-Ingmar Flock

## ABSTRACT

A great number of pathogens secrete pore-forming proteins during infection. Such molecules, from either bacterial or viral origin, are considered important virulence factors, which makes them attractive targets in the study of new therapeutic agents. Thus, the inhibitory activity of isatin-Schiff base copper(II) complexes was evaluated against membrane damage activity of *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ -HL). For this purpose, a standard hemolysis assay with rabbit erythrocytes and micromolar concentrations of the compounds was employed. Additionally, planar artificial lipid membranes with a single  $\alpha$ -HL ion channel and molecular docking studies were used to elucidate the molecular mechanism of the complexes. Accordingly, the compounds were observed to possess a significant anti-hemolytic activity, capable of interacting with the constriction region of  $\alpha$ -HL channel and blocking it in a potential dependent manner. Based on these results, it is expected that such isatin-Schiff base Copper(II) complexes may be employed as cotherapeutic agents for the treatment of staphylococcal infections.

**Keywords:** isatin-Schiff; copper(II) complexes; antibacterial;  $\alpha$ -hemolysin; ion channel; *Staphylococcus aureus*

## INTRODUCTION

Since the early 1940s, when penicillin was introduced as a therapeutic agent for infection, the ability of *Staphylococcus aureus* to acquire resistance to antibiotics has been known, as reviewed in Pantosti, Sanchini and Monaco (2007). After two decades, around 80 percent of bacterial isolates were identified as penicillin-resistant (Appelbaum 2007), and the first attempt to counteract an antibiotic resistance was performed,

with methicillin (Pantosti, Sanchini and Monaco 2007). Its introduction was rapidly followed by reports on methicillin-resistant isolates (Jevons 1961). Although other penicillins have replaced this compound in clinical use, the designation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been maintained (Pantosti, Sanchini and Monaco 2007). Nowadays, MRSA are found worldwide, and most are multidrug resistant, as reviewed in Appelbaum (2007), that is, not only to all  $\beta$ -lactam antibiotics,

Received: 21 August 2015; Accepted: 23 October 2015

© FEMS 2015. All rights reserved. For permissions, please e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

but also to macrolides, aminoglycosides and fluoroquinolones (Pantosti, Sanchini and Monaco 2007).

Considering the increase in MRSA and multidrug resistant strains, the search for new antibiotics, targeting different bacterial machinery, has emerged. In this context, isatin-Schiff bases are known to possess a wide range of pharmacological properties, as anticonvulsant (Varma et al. 2004), anti-HIV (Pandeya et al. 1999a; Pandeya et al. 1999b), antifungal (Pandeya et al. 1999a), antiviral (Singh, Shukla and Awasthi 1983), anti-protozoa (Beraldo and Gambino 2004) and, of interest, antibacterial (Varma and Nobles 1975; Pandeya and Sriram 1998; Bacchi et al. 2005). Additionally, bacterial pore-forming proteins are being increasingly recognized as important virulence factors, including *S. aureus*  $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ -HL), as in arthritis (Nilsson et al. 1999) and other leukocyte inflammatory responses (Berube and Wardenburg 2013).  $\alpha$ -HL is a monomer secreted during *S. aureus* exponential growth, and oligomerizes into the host membranes as an heptameric transmembrane pore, causing osmotic cytolysis (Gouaux et al. 1994). Previous studies have evaluated the activity of several compounds to inhibit  $\alpha$ -HL action, by hindering its membrane assembly (Qiu et al. 2013; Rani et al. 2014), or by direct blocking  $\alpha$ -HL ion channel (Karginov et al. 2007; Teixeira et al. 2009).

In the search for new bioactive compounds targeting *S. aureus*  $\alpha$ -HL, in this work were tested two different salts of a isatin-Schiff base copper(II) complex, herein named Cu(isapn), with perchlorate—[Cu(isapn)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>—or sulfonate—[Cu(isapn)](SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Accordingly, hemolysis assays and single channel experiments under voltage-clamp conditions in planar artificial lipid membranes were performed. Moreover, molecular docking studies provided atomic level details on protein-ligand interactions. These data are expected to expand the knowledge on compounds molecular recognition by the heptameric pore, while isatin-Schiff base copper(II) complexes are suggested as possible cotherapeutic agents for the treatment of *S. aureus* infected patients.

## MATERIALS AND METHODS

### $\alpha$ -HL protein and other chemicals

Wild type *S. aureus*  $\alpha$ -HL was kindly supplied by Dr. Hagan Bayley (University of Oxford, Oxford, United Kingdom). 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DiPhyPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Milli-Q plus treated water (Millipore, Bedford, MA) with resistivity of 18 M $\Omega$  cm was used to prepare all solutions. Two isatin-Schiff base copper(II) complexes, prepared as salts with perchlorate—[Cu(isapn)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>—or sulfonate—[Cu(isapn)](SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>—were employed, where isapn = N,N'-[bis-(3,3'-indolin-2-one)]-1,3-diiminepropane. These compounds were previously prepared and characterized by different techniques (Caramori, Parreira and Costa-Ferreira 2011; Filomeni et al. 2011).

### Hemolytic assay

A standard hemolytic assay was used, as previously adapted to a 96-well plate format in a previous publication of our group (Yuldasheva et al. 2005). Rabbit erythrocytes were prepared as previously described (Krasilnikov et al. 1997). For these experiments, the buffer solution (BS) contained 150 mM NaCl, 5 mM Tris-OH, pH 7.5. Hemolysis was assayed at 25 $\pm$ 2°C and repeatedly measured by quantifying absorbance at 655 nm in all wells at 5-min intervals. In each well, the final volume was 100  $\mu$ l, with

1% erythrocytes concentration, in which the copper(II) complexes were added before of the  $\alpha$ -HL in the test wells. Negative control was measured on wells only containing the 1% erythrocyte suspension in BS, while the 100% hemolysis, to which the percentage of lysis in other wells was calculated, were taken from wells with erythrocytes lysed with 2% Triton X-100 (Yuldasheva et al. 2005). The lysis half-time (T<sub>50%</sub>), which indicates the time at which about 50% of erythrocytes are no more viable, was used as a criterion of  $\alpha$ -HL hemolytic activity and the complexes inhibitory activity.

### Single channel reconstitution in planar lipid bilayer

Planar lipid bilayer membranes were formed as previously described (Montal and Mueller 1972), where the bilayers were composed of two DiPhyPC monolayers. After membrane stabilization, a 0.1–0.4  $\mu$ l of the stock solution containing  $\alpha$ -HL (0.07 mg/ml) was added to the standard solution (4 M KCl, 5 mM Tris-OH, pH 7.5) in cis compartment of the experimental chamber, to provide final concentrations of  $\sim$ 2 ng ml<sup>-1</sup>. After the ion channel was incorporated in bilayer membrane, the copper(II) complexes were also added to the standard solution to the cis compartment. All experiments were performed at room temperature (25 $\pm$ 2°C) using an Axopatch 200A amplifier in the voltage clamp mode. All steps from measuring current to analyzing data were performed with equipment and software that are described in previous studies (Krasilnikov et al. 1999, 2000; Teixeira et al. 2009; Rodrigues et al. 2011).

### Molecular docking studies

The  $\alpha$ -HL heptameric channel structure was retrieved from PDB ID 7AHL (Song et al. 1996), and coordinates for Cu(isapn) were obtained from HF/6-31G\* calculations. The molecular docking experiments were performed using Autodock4 program (Morris et al. 2009) and DockThor online portal (Magalhães et al. 2014). A genetic algorithm and the Lamarckian genetic algorithm were used for DockThor and Autodock, respectively, with each program standard docking parameters. As there are no copper parameters available for Autodock, five docking runs were performed with calcium, iron, magnesium, manganese and zinc, all providing equivalent results. In both cases, the atomic coordinates of the lowest energy conformations were clustered based in a root-mean-squared-deviation of 2.0 Å. The output conformers from both programs, which showed favorable interaction energies with  $\alpha$ -HL, were sorted in order of increasing energy and the two lowest energy docked conformations from each program were retrieved for further analysis.

## RESULTS

### Inhibiting the hemolytic activity of $\alpha$ -HL

The complexes [Cu(isapn)](SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> and [Cu(isapn)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> inhibited the toxin-provoked hemolysis in a dose-dependent manner (Fig. 1). The three tested solution concentrations provided some increase in cell viability in comparison to positive control during the time course of the experiment, although the addition of 0.40  $\mu$ g/ml of each compound had almost no more effect after 45 minutes (Fig. 1, diamonds). Moreover, T<sub>50%</sub> was 10–15 min in positive control assay (Fig. 1, circles). In this context, the Cu(isapn) solution concentration required to delay such parameter was different for its salts with perchlorate and sulfonate.



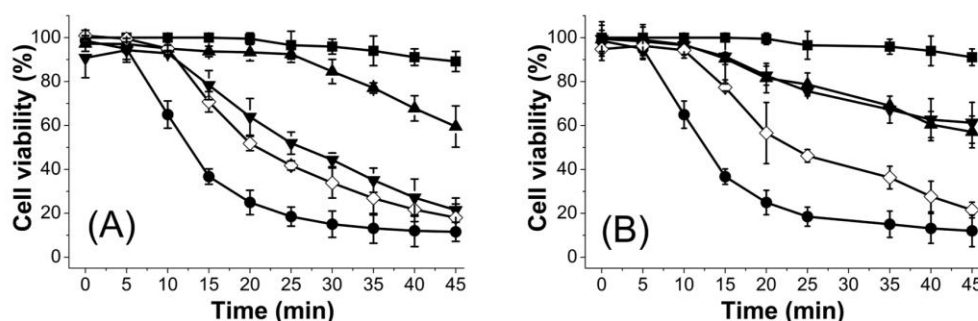


Figure 1. Anti-hemolytic activity of copper(II) complexes. Erythrocytes exposure to the  $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  (up triangles),  $0.80 \mu\text{g ml}^{-1}$  (down triangles),  $0.40 \mu\text{g ml}^{-1}$  (diamonds) of (A)  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$  or (B)  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$ . (squares) Negative control assay, (circles) positive control assay. Data are the mean  $\pm$  SD for at least four experiments.

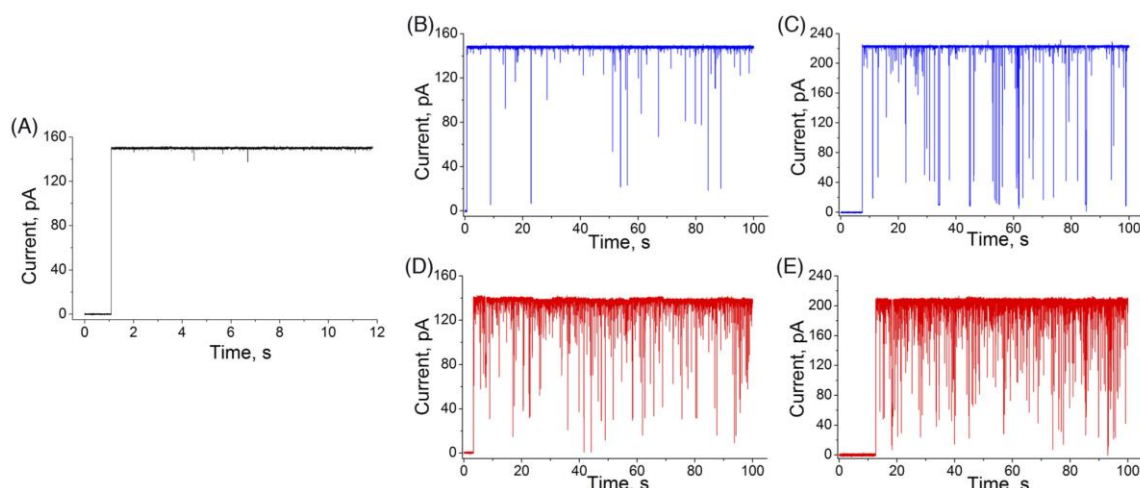


Figure 2. Effects of copper(II) complexes in the single  $\alpha$ -HL channel. The ionic current through a single  $\alpha$ -HL channel in the absence (A) and presence of  $100 \mu\text{M}$  of  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$  (B-C, blue records) and  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$  (D-E, red records). Transmembrane potential:  $40 \text{ mV}$  (A-B and D);  $60 \text{ mV}$  (C and E).

Specifically, the addition of  $0.80 \mu\text{g/ml}$  of  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$  is enough to take  $T_{50\%}$  to more than 45 min (Fig. 1B, down triangles), while  $1.5 \mu\text{g/ml}$  of  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$  is required for the same purpose (Fig. 1A, up triangles). Thus,  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$  appears to be more effective on maintaining rabbit erythrocytes viability exposed to  $\alpha$ -HL.

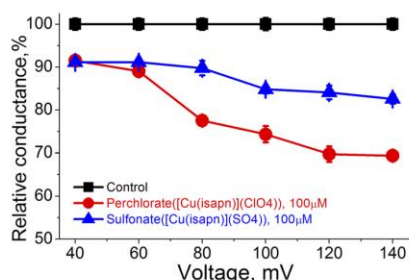
#### Isatin-Schiff base copper(II) complexes blocked the ion channel formed by $\alpha$ -HL

The complexes  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$  and  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$  decreased the ionic flow through the channel (Fig. 2). Typical recordings of an ion current through a single  $\alpha$ -HL channel before and after the addition of  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$  and  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$  were observed (Fig. 2). The addition of  $100 \mu\text{M}$  of compounds to the cis-side of the membrane caused blockages of the pore (Fig. 2B-E). The presence of  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$  in the bath solution provides a higher frequency of blockades when compared to  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$  (Fig. 2B-E). More effectively than  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{SO}_4)_2$ ,  $[\text{Cu}(\text{isapn})](\text{ClO}_4)_2$  induced a fast block of the pore, with transitions to either an essentially non-conducting state or to a state with approximately 60% of current (Fig. 2D-E).

In addition, the relative conductance of the channel on the presence of the compounds is smaller than in the standard solution and decrease with the transmembrane potential, so the effect is voltage dependent (Fig. 3).

#### Molecular docking studies

In order to obtain atomic-level insights into the copper(II) complexes mechanism of action, docking experiments were carried out to predict the position and orientation of  $\text{Cu}(\text{isapn})$  on the surface of  $\alpha$ -HL. The protein-ligand contact consistently observed in the four considered structures comprise an ionic bond between positively charged copper(II) in  $\text{Cu}(\text{isapn})$  and Glu111 sidechain carboxylate group of  $\alpha$ -HL monomers. Based on LIG-PLOT analysis, from three to eight amino acid residues were observed to interact with the compound (Table 1), located in one to three of the protein chains. Besides Glu111, Lys147 and Val149 are also always involved in this binding. While two conformers docked in similar regions of the protein surface (Autodock 2 and DockThor 1), a rearrangement of these four structures along the constriction provides few atomic superimposition (Fig. 4A). Nevertheless, although mostly interacting with the



**Figure 3.** Voltage dependence of the copper(II) complexes effects. The channel conductance in the absence of the copper complex was considered as 100% (control). The channel conductance in the presence of copper(II) complexes was relativized as the control condition. Data are as mean  $\pm$  SD for at least four experiments.

**Table 1.** Contacts between Cu(isapn) and  $\alpha$ -HL amino acid residues and domains.

| $\alpha$ -HL amino acid residue | Docking model |            |            |            |
|---------------------------------|---------------|------------|------------|------------|
|                                 | Autodock 1    | Autodock 2 | Dockthor 1 | Dockthor 2 |
| Thr109                          | F             | F          | –          | –          |
| Lys110                          | F             | –          | –          | –          |
| Glu111                          | D, E, F       | F, G       | F, G       | A          |
| Lys147                          | D, E          | F, G       | G          | A          |
| Thr148                          | –             | F          | –          | –          |
| Val149                          | F             | F, G       | A, F, G    | B          |

protein surface, all of the four evaluated conformers contribute for a partial degree of channel blockade (Fig. 4D–G), and may stand for some of the blocking events observed in single channel experiments (Fig. 2). Besides, based on the obtained structures,

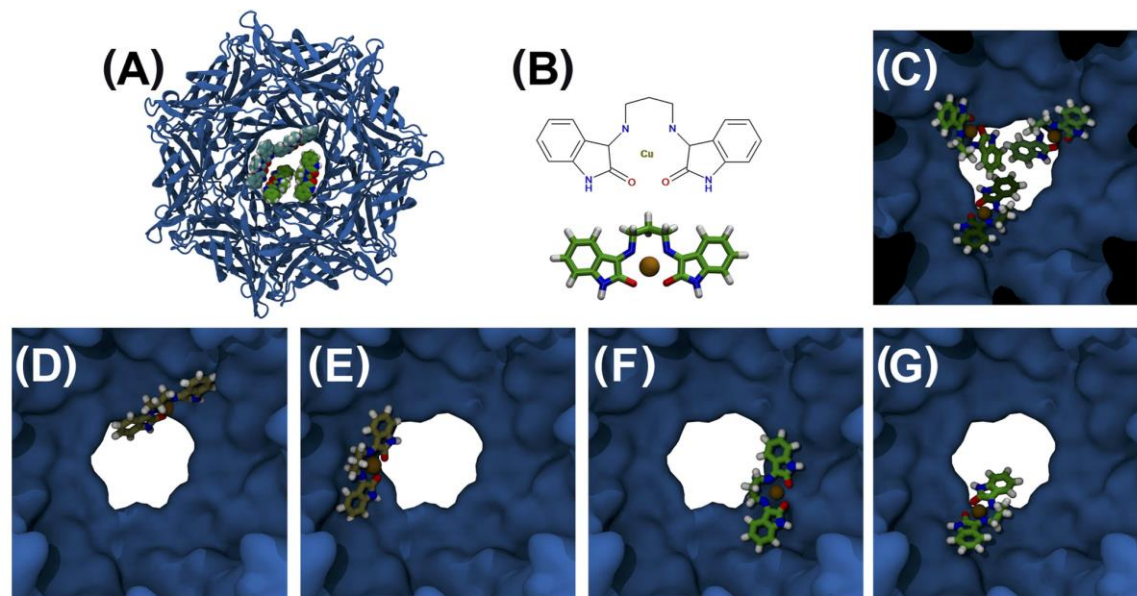
it may be proposed that a minimum of three Cu(isapn) structures are required to occlude the ionic flow through the channel by obstructing the  $\alpha$ -HL constriction region (Fig. 4C).

## DISCUSSION

Considering the  $\alpha$ -HL importance in *S. aureus* pathogenesis, it emerges as an attractive target in the search for new therapeutic agents. Two mechanisms of  $\alpha$ -HL inhibition by bioactive compounds has been identified. On one hand, natural compounds (Qiu et al. 2013) and synthetic peptides (Rani et al. 2014) block the assembly of the heptameric channel by interacting with the protein monomer, and hindering the mobility of the transmembrane region not yet inserted into the host cell membrane. On the other hand, cyclodextrins derivatives (Karginov et al. 2007) and heparin (Teixeira et al. 2009) make a direct blockade of ionic flow through of the  $\alpha$ -HL channel. Typically, the ionic current through the  $\alpha$ -HL channel bathed by only electrolytes solution is quiescent (Rodrigues et al. 2011). Here, [Cu(isapn)](SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> and [Cu(isapn)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> have been evidenced in decreasing of the ionic flow in a single channel (Fig. 2). Such reductions are due to the interaction of these compounds with constriction of the channel. Thus, the mechanism of action of these complexes is similar to heparin and cyclodextrins derivatives (Karginov et al. 2007; Teixeira et al. 2009). The greater efficiency of the [Cu(isapn)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> at protection of erythrocytes is due to their greater blocking capacity of the channel, as shown more frequent blockages in the ionic current records (Fig. 2) and greater decrease in the relative conductance (Fig. 3). These findings suggest that this compound exhibits greater residual electric charge in the standard solution.

## CONCLUSION

The isatin-Schiff base copper(II) complexes protects red cells from the hemolysing action caused by alpha-hemolysin from



**Figure 4.** Docked Cu(isapn) onto  $\alpha$ -HL constriction region of the channel. In (A), the four conformers are represented in the context of the entire protein. In (B), Cu(isapn) molecular structure is shown. In (C), a proposal for the ion channel blockade with three compounds is presented. The binding poses derived from Autodock (D–E) and Dockthor (F–G) are also shown in the constriction region.



*S. aureus*. The anti-hemolytic effect of these complexes is due to the blockages which occur in the region of constriction of the channel formed by alpha-hemolysin. The molecular mechanism of these blockages is given by the interaction of copper with the glutamine residues of the heptamers forming the alpha-hemolysin channel. These findings suggest the possibility to use these compounds as cotherapeutic agents in the treatment of infections whose etiologic agent is *S. aureus*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Ana Maria Ferreira of Institute of Chemical of University of São Paulo, by the synthesis of copper complexes. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Grant number: APQ-0398-1.06/13), Brazil.

**Conflict of interest.** None declared.

## REFERENCES

- Appelbaum PC. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2007;45:S165–S70.
- Bacchi A, Carcelli M, Pelagatti P, et al. Antimicrobial and mutagenic properties of organotin(IV) complexes with isatin and N-alkylisatin bisthiocarbonohydrazones *J Inorg Biochem* 2005;99:397–408.
- Beraldo H, Gambino D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini-Rev Med Chem* 2004;4:31–9.
- Berube BJ, Wardenburg JB. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)* 2013;5:1140–66.
- Caramori GF, Parreira RLT, Costa-Ferreira AM. Isatin-Schiff base copper(II) complexes - a DFT study of the metal-ligand bonding situation. *Int J Quantum Chem* 2011;112:625–46.
- Filomeni G, Cardaci S, Costa-Ferreira AM, et al. Metabolic oxidative stress elicited by the copper(II) complex [Cu(isaepy)]<sub>2</sub> triggers apoptosis in SH-SY5Y cells through the induction of the AMP-activated protein kinase/p38MAPK/p53 signalling axis: evidence for a combined use with 3-bromopyruvate in neuroblastoma treatment. *Biochem J* 2011;437:443–53.
- Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, et al. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl A Sci USA* 1994;91:12828–31.
- Jevons M. 'Celbenin' - resistant *Staphylococci*. *Brit Med J* 1961;1:124.
- Karginov VA, Nestorovich EM, Schmidtman F, et al. Inhibition of *S. aureus* alpha-hemolysin and *B. anthracis* lethal toxin by beta-cyclodextrin derivatives. *Bioorg Med Chem* 2007;15:5424–31.
- Krasilnikov OV, Capistrano MP, Yuldasheva LN, et al. Influence of Cys-130 *S. aureus* alpha-toxin on planar lipid bilayer and erythrocyte membranes. *J Membrane Biol* 1997;156:157–72.
- Krasilnikov OV, Merzlyak PG, Yuldasheva LN, et al. Heparin influence on alpha-staphylo toxin formed channel. *Biochim Biophys Acta* 1999;1417:167–82.
- Krasilnikov OV, Merzlyak PG, Yuldasheva LN, et al. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol Microbiol* 2000;37:1372–8.
- Magalhães CS, Marinho-Almeida D, Barbosa HJC, et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking of highly flexible ligands. *Inform Sciences* 2014;289:206–24.
- Montal M, Mueller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc Natl A Sci USA* 1972;69:3561–6.
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009;30:2785–91.
- Nilsson I-M, Hartford O, Foster T, et al. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infect Immun* 1999;67:1045–9.
- Pandeya SN, Sriram D. Synthesis and screening for antibacterial activity of Schiff's and Mannich bases of isatin and its derivatives. *Acta Pharmaceut Turc*. 1998;40:33–8.
- Pandeya SN, Sriram D, Nath G, et al. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and N-[4-(4-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. *Eur J Pharm Sci* 1999a;9:25–31.
- Pandeya SN, Yogeeswari P, Sriram D, et al. Synthesis and screening for anti-HIV activity of some N-mannich bases of isatin derivatives. *Chemotherapy* 1999b;45:192–6.
- Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*. 2007;2:323–34.
- Qiu J, Wang D, Zhang Y, et al. Molecular modeling reveals the novel inhibition mechanism and binding mode of three natural compounds to *Staphylococcal* alpha-hemolysin. *PLOS One* 2013;8:e80197.
- Rani N, Saravanan V, Lakshmi PTV, et al. Inhibition of pore formation by blocking the assembly of *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin through a novel peptide inhibitor: an in silico approach. *Int J Pept Res Ther* 2014;20:575–83.
- Rodrigues CG, Machado DC, Da Silva AM, et al. Hofmeister effect in confined spaces: halogen ions and single molecule detection. *Biophys J* 2011;100:2929–35.
- Singh SP, Shukla SK, Awasthi LP. Synthesis of some 3-(4'-nitrobenzoylhydrazono)-2-indolinones as a potential antiviral agents. *Curr Sci* 1983;52:766–9.
- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996;274:1859–66.
- Teixeira LR, Merzlyak PG, Valeva A, et al. Interaction of heparins and dextran sulfates with a mesoscopic protein nanopore. *Biophys J* 2009;97:2894–903.
- Varma M, Pandeya SN, Singh KN, et al. Anticonvulsant activity of Schiff bases of isatin derivatives. *Acta Pharmaceut* 2004;54:49–56.
- Varma RS, Nobles WL. Antiviral, antibacterial, and antifungal activities of isatin N Mannich bases. *J Pharm Sci* 1975;64:881–2.
- Yuldasheva LN, Carvalho EB, Catanho M-TJA, et al. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1061–70.

## 5.2 Manuscrito a ser submetido à revista *Biopolymers: Peptide Science*

# Monomeric *Staphylococcus aureus* $\delta$ -toxin behavior in aqueous solution

Maria Carolina de Araujo Melo<sup>a</sup>, Cláudio Gabriel Rodrigues<sup>a</sup> and Laercio Pol-Fachin<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

<sup>b</sup>*Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

<sup>c</sup>*Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil*

## Abstract

$\delta$ -toxin is a 26 amino acid peptide with no antimicrobial activity, but capable of lysing a wide range of mammalian cell types, as erythrocytes, and subcellular structures, as membrane-bound organelles. Structurally,  $\delta$ -toxin predominantly exhibits a  $\alpha$ -helical secondary structure in phospholipids-composed membranes but, in aqueous solution, it adopts varying helical content. As no structural, atomic-level data is available for this peptide in aqueous solutions and for the water-to-membrane transition, this work aims to characterize  $\delta$ -toxin behavior in these conditions through unbiased molecular dynamics simulations employing four different parameter sets. The obtained results, validated on previous circular dichroism and nuclear magnetic resonance data, suggest that the peptide has from around 5 to 14 residues folded as  $\alpha$ -helix in aqueous solution, including amino acid residues 7 to 20. Additionally, the  $\delta$ -toxin water-to-membrane *foldamer* is proposed to be the region comprising residues 7-12. Among the employed force fields, the GROMOS 54A7 and CHARMM36 provided the results in better agreement with the experiments, but the former presents a higher conformational sampling in the same timescale. The obtained results are expected to contribute in future studies on  $\delta$ -toxin aggregation and interaction to membranes.

## Introduction

*Staphylococcus aureus* is a ubiquitous, Gram positive, non motile coccus microorganism, which grows as grape-like clusters<sup>1</sup>. It is a natural human commensal, found for instance in the skin and throat<sup>1</sup>. As a pathogen, it is a leading cause of hospital-associated (HA) and community-associated (CA) infections worldwide<sup>2</sup>. Mostly all strains produce and secrete several exoproteins to convert local host tissues into nutrients for its growth<sup>3</sup>. As a consequence, such molecules will contribute to the bacteria colonization on target materials and cause diseases in mammalian species<sup>3</sup>. Such proteins

include several enzymes and cytotoxins, as nucleases, proteases, lipases, and four hemolysins, named as  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -toxins<sup>3</sup>. While the  $\beta$ -lysin hemolytic activity is attributed to the enzymatic degradation of membrane sphingolipids, the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -toxins are known to form  $\beta$ -barrel pores in host cell membranes<sup>3</sup>. On the other hand, regarding  $\delta$ -hemolysin mechanism of action, two distinct sets of events were proposed, in which the peptide displays a concentration-dependent activity<sup>4</sup>. Thus,  $\delta$ -toxin would either act as a surfactant to permeabilize and disrupt the cell membrane when at small concentrations<sup>5,6</sup>, or to assume a multimeric pore conformation when at higher concentrations<sup>7-10</sup>.

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica  
Dissertação – Maria Carolina de Araujo Melo

The  $\delta$ -toxin is a 26 amino acid peptide, displaying limited or nonexistent antimicrobial activity against bacteria<sup>11,12</sup>. However, it lyses and disrupts bacterial protoplasts, spheroplasts, lysosomes and lipid spherules<sup>12</sup>. Also, it is active against a wide range of mammalian cell types, as erythrocytes, and is capable of lysing subcellular structures, as membrane-bound organelles<sup>4</sup>. Structurally,  $\delta$ -lysin predominantly exhibits a  $\alpha$ -helical secondary structure in phospholipid bilayers and membrane-mimetic environments, with 15-20 folded residues<sup>13-17</sup>. In aqueous solution, however, it adopts varying helical content, which is dependent on its concentration<sup>11,18,19</sup>. Although this much knowledge about  $\delta$ -toxin behavior, no structural, atomic-level data is available for this peptide in aqueous solutions and for the water-to-membrane transition.

In this context, the present work intends to characterize the structure and conformation of  $\delta$ -hemolysin in aqueous solutions. For this purpose, unbiased molecular dynamics (MD) simulations were performed for this peptide employing four different force fields. Validation on these simulations was achieved with  $\delta$ -toxin structural data on membrane-mimetic environments. Based on the obtained results, the foldamer for the water-to-membrane transition could be proposed. Additionally, while offering a global view on MD force field behavior on peptide folding, these data are expected to contribute in future studies on  $\delta$ -hemolysin aggregation and interaction to membranes.

## Materials and Methods

The recommendations and symbols of nomenclature as proposed by IUPAC<sup>20</sup> were used. The manipulation and visualization of structures, as well as structure figures, were performed with VMD<sup>21</sup>. The secondary structure content analysis were performed with the Dictionary of Secondary Structure of Proteins (DSSP)<sup>22</sup>. All the MD calculations and remaining analysis were performed using the GROMACS package, version 4.5.1<sup>23</sup>, employing four different force fields: AMBER99<sup>24</sup>,

CHARMM36<sup>25</sup>, GROMOS54A7<sup>26</sup>, and OPLS-AA<sup>27</sup>.

The  $\delta$ -toxin three-dimensional structure was retrieved from PDB ID 1DTC<sup>13</sup>. It contains twenty NMR-derived models, which were clusterized in order to obtain the most representative structure for the peptide. As a consequence, model 2 was selected as the starting point for all monomeric  $\delta$ -toxin MD simulations. For this purpose, eight systems were studied, in which each of the four parameter sets were used to study the peptide in dodecahedron boxes, surrounded by water or methanol.  $\delta$ -toxin dimers, obtained from molecular docking studies, were also submitted to MD simulations in water. Periodic boundary conditions were employed, with at least 10 Å distance from the outside of the structure and the box edge. The SPC water model<sup>28</sup> was used for GROMOS 54A7 simulation in water, TIP3P water model<sup>29</sup> for AMBER99 and CHARMM36 MD calculations and TIP4P<sup>29</sup> water model for simulations with OPLS. The Lincs method<sup>30</sup> was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2 fs after an initial energy minimization using Steepest Descents algorithm. Electrostatic interactions were calculated through the Particle-Mesh Ewald method<sup>31</sup>. The temperature was maintained at 310 K by coupling the system with V-rescale thermostat<sup>32</sup> with a relaxation time of 0.1 ps. Pressure was kept at 1 bar using a Parrinello-Rahman barostat<sup>33,34</sup> via an isotropic coordinate scaling with a coupling constant of 2.0 ps and a compressibility of  $4.5 \times 10^{-5}$  bar. A 1 ns MD simulation with position restraints was performed as an equilibration period, and was not taken into account to calculate the average ensemble properties. Subsequently, all simulations were further extended to 200 ns.

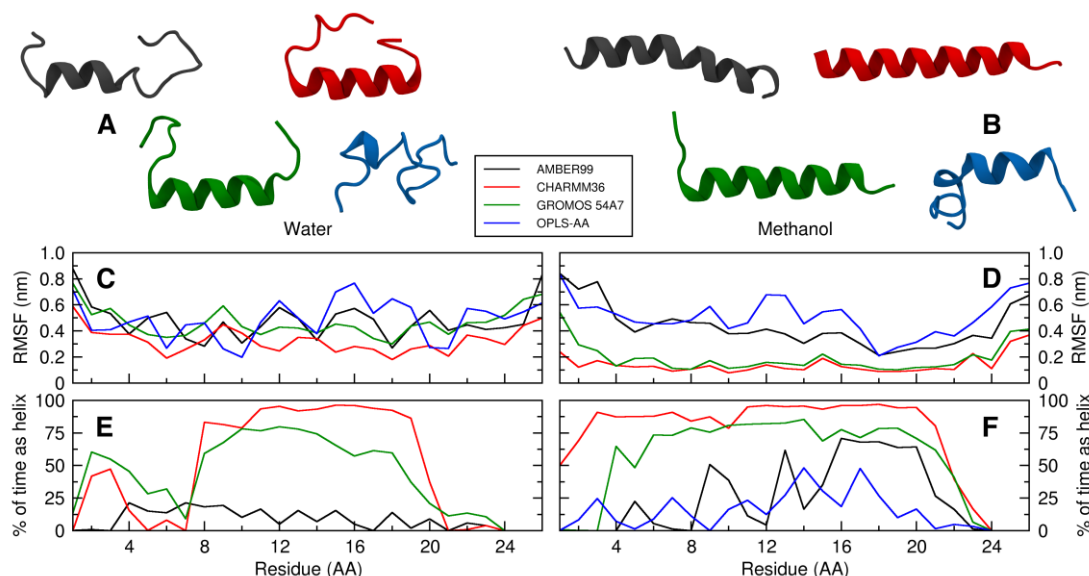
## Results and Discussion

The starting  $\delta$ -toxin structure for MD simulations comprises a  $\alpha$ -helix conformation, folded from residues 2 to 22. Such behavior was obtained in 2:1 proportion of methanol and water<sup>13</sup>. In pure methanol, which also mimics membrane environments,  $\delta$ -toxin is expected to present around fourteen folded residues<sup>13-17</sup>. Based on



this data, in the four MD calculations in methanol (Fig. 1B), the correct number of folded residues was only achieved using CHARMM36 and GROMOS 54A7 force fields (Fig. 1F). Specifically, CHARMM36 parameter set mostly maintained the NMR-obtained helical content, while GROMOS 54A7 presented residues 3 to 22 folded during over 80% of the trajectory (Fig. 1F). On the other hand, the AMBER99 and

OPLS-AA simulations provided highly flexible patterns for the peptide (Fig. 1D), with a reduced and more diffuse  $\alpha$ -helical content (Fig. 1F). Overall, the employed force fields sampled 36-86 % of  $\alpha$ -helix (Table 1) and 12-27 % of loops for the entire peptide (Table 1). Still, some amount of bend and turn secondary structures types were observed during AMBER99 and OPLS-AA simulations (Table 1).



**FIGURE 1.** MD simulations of  $\delta$ -toxin monomers in water and methanol environments. In (A-B), representative structures for each trajectory are shown presented in ribbon diagram. In (C-D), the root mean square fluctuation (RMSF) analyses for the final 100 ns of MD calculations are presented. In (E-F), the ellipticity at 222 nm is shown, representing the % of time in which each residue present a helical character, as analyzed for the second half of simulations.

Table 1. Secondary structure content, as analyzed with DSSP, for the monomeric  $\delta$ -toxin MD simulations.

| Secondary structure type | Percentage of secondary structure (methanol/water) |          |             |         |
|--------------------------|----------------------------------------------------|----------|-------------|---------|
|                          | AMBER99                                            | CHARMM36 | GROMOS 54A7 | OPLS-AA |
| Loop                     | 23 / 29                                            | 12 / 28  | 24 / 25     | 27 / 30 |
| $\beta$ -bridge          | 0 / 0                                              | 0 / 0    | 0 / 0       | 0 / 4   |
| Bend                     | 6 / 14                                             | 0 / 6    | 3 / 9       | 14 / 16 |
| Turn                     | 14 / 27                                            | 2 / 12   | 2 / 9       | 17 / 27 |
| $\alpha$ -helix          | 49 / 24                                            | 86 / 51  | 71 / 56     | 36 / 4  |
| $3_{10}$ -helix          | 8 / 6                                              | 0 / 3    | 0 / 1       | 6 / 19  |

The helical content was always higher in methanol than in water simulations (Fig. 1E-F). In aqueous solution, thus, the peptide has undergone some significant conformational modifications (Fig. 1A), although showed equivalent per-residue flexibilities independently on the employed force field (Fig. 1B). In all simulations, a reduction in secondary structure content is observed for  $\delta$ -toxin, in accordance to previous experimental data<sup>11,18</sup>, and differences in the resulting structures were observed between

the four employed force fields (Fig. 1A and 1E). As occurred using methanol as solvent, the simulations using the GROMOS 54A7 and CHARMM36 force fields provided equivalent results, in which the peptide was folded from residues 7 to 20 (Fig. 1E). Moreover, the AMBER99 and OPLS-AA parameter sets also present equivalent profiles for  $\delta$ -toxin, in which a small  $\alpha$ -helical content could be observed (Fig. 1E). In fact, as a general feature, from 4-56 % of  $\alpha$ -helix was sampled during simulations in water

(Table 1), which suggests that that the peptide may show from around 1 to 14 residues folded as  $\alpha$ -helix in aqueous solution. On the other hand, around 30 % of loops were sampled by the employed parameter sets (Table 1) and, as occurred in methanol, a significant amount of bend and turn secondary structure types were observed (Table 1).

Regarding the simulations in both water and methanol, all structures sampled in each MD simulation can be distinguished using a root mean square deviation (RMSD) of 0.5 Å, but each entire trajectory form a single conformational cluster, employing a 3 Å RMSD cutoff (Table 2). Markedly, the GROMOS 54A7 force field is capable of sampling a higher

number of different structures when compared to all other three parameter sets in aqueous solutions, and to CHARMM36 and AMBER99 in methanol (Table 2). Moreover, equivalent conformers are sampled when comparing the results from GROMOS 54A7 and OPLS-AA, in spite of the high degree of unfolding observed for the latter in methanol (Table 2). Altogether, the data from monomeric  $\delta$ -toxin MD simulations suggests a higher adequacy of CHARMM36 and GROMOS 54A7 parameters to describe the peptide behavior both in methanol and aqueous solutions. Additionally, the GROMOS 54A7 force field is capable of sampling a higher number of structures when compared to the other evaluated parameter sets, employing the same time scale.

Table 2. Clustering analyses performed on the monomeric  $\delta$ -toxin MD simulations.

| Cutoff (Å) | Number of different clusters (methanol/water) |             |             |             |
|------------|-----------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|            | AMBER99                                       | CHARMM36    | GROMOS 54A7 | OPLS-AA     |
| 0.10       | 5001 / 5001                                   | 5001 / 5001 | 5001 / 5001 | 5001 / 5001 |
| 0.50       | 5001 / 5001                                   | 5001 / 5001 | 5001 / 5001 | 5001 / 5001 |
| 1.00       | 4690 / 4359                                   | 2742 / 1031 | 4911 / 4940 | 3984 / 4083 |
| 1.50       | 978 / 586                                     | 39 / 1      | 1501 / 610  | 84 / 729    |
| 2.00       | 28 / 6                                        | 1 / 1       | 86 / 10     | 1 / 13      |
| 2.50       | 1 / 1                                         | 1 / 1       | 2 / 6       | 1 / 1       |
| 3.00       | 1 / 1                                         | 1 / 1       | 1 / 1       | 1 / 1       |

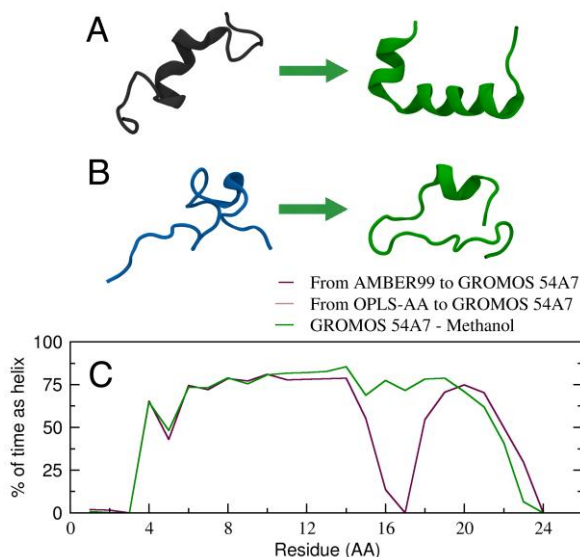
Based on this observation, two additional simulations were performed employing the GROMOS 54A7 force field on the most representative structure from AMBER99 and OPLS-AA MD simulations in water. Such simulations aimed to evaluate whether  $\delta$ -toxin folds back to full  $\alpha$ -helical content from unstructured conformations. In fact, both starting structures had quite similar secondary structure contents. Specifically, amino acid residues folded as  $\alpha$ -helix were described from 7 to 12 for AMBER99 and for the regions 7-9 and 11-13 for OPLS-AA water simulations (Fig. 2A-B). In spite of that, as no four consecutive residues were observed as folded, in practice, no  $\alpha$ -helix is present in the latter structure. After 200ns MD simulations, the AMBER99-derived structure mostly folded back to a full  $\alpha$ -helix, with the only exception of Ile16 and Ile17 (Fig. 2C). In this context, considering the increased conformational restriction promoted by the bulky C $\beta$ -branching in this residue side chain, and the known difficulties on isoleucine structural

refinement<sup>35</sup>, the poorly folded Ile16 and Ile17, observed in this MD simulation, may arise from an insufficient sampling. Altogether, such results suggest that the peptide region ranging from 7-12 is a foldamer, that is, a nucleation point for  $\delta$ -toxin folding into a full  $\alpha$ -helix upon membrane insertion.

## Conclusions

In this work,  $\delta$ -toxin has been studied through long time scales MD simulations with four different parameter sets. The obtained data was validated based on previous circular dichroism and nuclear magnetic resonance data, in terms of the conformational profile adopted by the peptide. In aqueous solution, our results suggest that the peptide has from 5 to 14 residues folded as  $\alpha$ -helix, depending on the employed force field. In this context, the involved amino acid residues range from Ser7 to Val20. Additionally, the  $\delta$ -toxin water-to-membrane foldamer was

proposed to be the region comprising residues 7-12. However, small perturbations as a single unfolded amino acid residue in this sequence may impair the return to a full  $\alpha$ -helical folding, as observed for Gly10 in the trajectory employing the GROMOS 54A7 force field on the most representative structure OPLS-AA MD simulation in water.



**FIGURE 2.** Monomeric  $\delta$ -toxin behavior as observed through MD simulations using the GROMOS 54A7 force field, starting from the most representative structures of AMBER99 and OPLS-AA MD simulations in water. In (A-B), the initial and the MD most representative structures are presented in ribbon diagram for (A) AMBER99 and (B) OPLS-AA. In (C), the ellipticity at 222 nm is shown (% of time in which the residues have a helical character).

Methodologically, among the employed force fields, the GROMOS 54A7 and CHARMM36 provided the results in better agreement with the experiments, for both water and methanol environments. Nevertheless, the GROMOS parameters set presented a higher conformational sampling in the same timescale, when compared to the other evaluated force fields, which facilitated the observation of the  $\delta$ -toxin folding and unfolding process. Altogether, the obtained results offer a global view on MD force field behavior on peptide folding and, additionally, are expected to contribute in future studies on  $\delta$ -toxin interaction to phospholipid membranes.

## Acknowledgments

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - MCT), by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – MEC), and by Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). The authors would like to gratefully acknowledge the Biomaterials Modelling Group (BIOMAT) and the Centro Nacional de Supercomputação (CESUP), from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) for computational resources.

## References

1. Nazari MR, Sekawi Z, Sadeghifard N, Raftari M, Ghafourian S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *Rev Med Microbiol* 2015;26:1-7.
2. Aman MJ, Adhikari RP. Staphylococcal bicomponent pore-forming toxins: targets for prophylaxis and immunotherapy. *Toxins* 2014;6:950-972.
3. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:16-34.
4. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud J-M, Hechard Y. Delta-hemolysin, an uptake on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 2009;30:817-818.
5. Bernheimer AW. Interactions between membranes and cytolytic bacterial toxins. *Biochim Biophys Acta* 1974;465:378-390.
6. Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:1529-1539.
7. Mellor IR, Thomas DH, Sansom MS. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim Biophys Acta* 1988;942:280-294.
8. Pokorny A, Birkbeck TH, Almeida PF. Mechanism and kinetics of delta-lysin interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 2002;41:11044-11056.

9. Raghunathan G, Seetharamulu P, Brooks BR, Guy HR. Models of delta-hemolysin membrane channels and crystal structures. *Proteins* 1990;8:213-225.
10. Talbot JC, Thiaudiere E, Vincent M, Gallay J, Siffert O, Dufourcq J. Dynamics and orientation of amphipathic peptides in solution and bound to membranes: a steady-state and time-resolved fluorescence study of staphylococcal delta-toxin and its synthetic analogues. *Eur Biophys J* 2001;30:147-161.
11. Dhople VM, Nagaraj R. Conformation and activity of delta-lysin and its analogs. *Peptides* 2005;26:217-225.
12. Kreger AS, Kim KS, Zaboretzky F, Bernheimer AW. Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin. *Infect Immun* 1971;3:449-465.
13. Bladon CM, Bladon P, Parkinson JA. Delta-toxin analogues as peptide models for protein ion channel. *Biochem Soc Trans* 1992.
14. Lee KH, Fitton JE, Wuthrich K. Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of delta-haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles. *Biochim Biophys Acta* 1987;911:144-153.
15. Lohner K, Staudegger E, Prenner EJ, Lewis RN, Kriechbaum M, Degovics G, McElhaney RN. Effect of staphylococcal delta-lysin on the thermotropic phase behavior and vesicle morphology of dimyristoylphosphatidylcholine lipid bilayer model membranes. Differential scanning calorimetric, <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectroscopic, and X-ray diffraction studies. *Biochemistry* 1999;38:16514-16528.
16. Tappin MJ, Pastore A, Norton RS, Freer JH, Campbell ID. High-resolution <sup>1</sup>H NMR study of the solution structure of delta-hemolysin. *Biochemistry* 1988;27:1643-1647.
17. Brauner JW, Mendelsohn R, G. PF. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared studies of the interaction of melittin, two fragments of melittin, and delta-hemolysin with phosphatidylcholines. *Biochemistry* 1987;26:8151-8158.
18. Colacicco G, Basu MK, Buckelew ARJ, Bernheimer AW. Surface properties of membrane systems. Transport of staphylococcal delta-toxin from aqueous to membrane phase. *Biochim Biophys Acta* 1977;465:378-390.
19. Thiaudiere E, Siffert O, Talbot JC, Bolard J, Alouf JE, Dufourcq J. The amphiphilic alpha-helix concept. Consequences on the structure of staphylococcal delta-toxin in solution and bound to lipids. *Eur J Biochem* 1991;195:203-213.
20. IUPAC. -IUBMB Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of carbohydrates. *Pure Appl Chem* 1996;68:1919-2008.
21. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graphics* 1996;14:33-38.
22. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern-recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 1983;22:2577-2637.
23. Hess B, Kutznet C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput* 2008;4:435-447.
24. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 2010;78:1950-1958.
25. Huang J, MacKerell ADJ. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem* 2013;34:2135-2145.
26. Schmid N, Eichenberger AP, Choutko A, Riniker S, Winger M, Mark AE, van Gunsteren WF. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J* 2011;40:843-856.
27. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS

- all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc* 1996;118:11225-11236.
28. Berendsen HJC, Grigera JR, Straatsma TP. The missing term in effective pair potentials. *J Phys Chem* 1987;91:6269-6271.
29. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 1983;79:926-935.
30. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* 1997;18:1463-1472.
31. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 1993;98:10089-10092.
32. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 2007;126:0141011.
33. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys* 1981;52:7182-7190.
34. Nosé S, Klein ML. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol Phys* 1983;50:1055-1076.
35. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009;30:2785-2791.
36. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* 1985;28:849-857.
37. Berntsen KRM, Vriend G. Anomalies in the refinement of isoleucine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014;D70:1037-1049.

## 6. CONCLUSÕES

- 1- Os complexos de cobre(II) base de Isatin-Schiff, perclorato de Cu(isapn) e sulfonato de Cu(isapn), inibem parcialmente a atividade hemolítica da  $\alpha$ -HL de *Staphylococcus aureus*;
- 2- Os complexos de cobre(II) base de Isatin-Schiff, perclorato de Cu(isapn) e sulfonato de Cu(isapn), bloqueiam parcialmente os canais de  $\alpha$ -HL de *Staphylococcus aureus*;
- 3- O mecanismo molecular do bloqueio do canal da  $\alpha$ -HL pelos complexos perclorato de Cu(isapn) e sulfonato de Cu(isapn) ocorre principalmente pela interação do cátion de Cu(II) com os resíduos de ácido glutâmico na posição 111 localizados na região de constrição deste canal;
- 4- A  $\delta$ -toxina de *S. aureus* em solução aquosa apresenta, incluindo a região entre os aminoácidos serina na posição 7 e a valina na posição 20, 5 a 14 resíduos enovelados.

## 7. PERSPECTIVAS

- 1- Avaliar, através de ensaios eletrofisiológicos, a capacidade dos complexos de cobre em inibir a oligomerização das subunidades protéicas, impedindo a formação do canal de  $\alpha$ -HL;
- 2- Avaliar a capacidade de outros compostos em bloquear o canal de  $\alpha$ -HL.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, R. P., *et al.* Lower antibody levels to *Staphylococcus aureus* exotoxins are associated with sepsis in hospitalized adults with invasive *S. aureus* infections. . **J. Infect. Dis.** , v.206, p.915–923, 2012.
- APPELBAUM, P. C. Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, p.S165-S170, 2007.
- BECHINGER, B., LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1758, p.1529-1539, 2006.
- BERNHEIMER, A. W. Interactions between membranes and cytolytic bacterial toxins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.465, p.378-390, 1974.
- BERUBE, B. J., WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus Aureus*  $\alpha$ -Toxin: Nearly a Century of Intrigue. **Toxins**, v.5, p.1140-1166, 2013.
- BHAKDI, S., MUHLY, M., FUSSLE, R. Correlation between toxin binding and hemolytic activity in membrane damage by staphylococcal alpha-toxin. **Infect. Immun.** , v.46, p.318–323, 1984.
- BLADON, C. M., BLADON, P., PARKINSON, J. A. Delta-toxin analogues as peptide models for protein ion channels. **Biochemical Society Transactions**, v.20, p.862-864, 1992.
- BRAUNER, J. W., MENDELSON, R., PRENDERGAST, F. G. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared studies of the interaction of melittin, two fragments of melittin, and delta-hemolysin with phosphatidylcholines. **Biochemistry**, v.26, p.8151-8158, 1987.
- CARAMORI, G. F., PARREIRA, R. L. T., COSTA-FERREIRA, A. M. D. Isatin-Schiff Base Copper(II) Complexes A DFT Study of the Metal-Ligand Bonding Situation. **Int. J. Quantum Chem.**, v.112, p.625-646, 2012.
- CERCHIARO, G., *et al.* Kinetic studies of carbohydrate oxidation catalyzed by novel isatin–Schiff base copper(II) complexes. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, v.221, p.29-39, 2004.
- CHAMBERS, H. F., DELEO, F. R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n.9, p.629-641, 2009.
- COLACICCO, G., *et al.* Surface properties of membrane systems. Transport of staphylococcal delta-toxin from aqueous to membrane phase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.465, p.378-390, 1977.
- COLQUHOUN, D., SIGWORTH, F. J. Fitting and statistical analysis of single-channel records. In: B. Sakmann e E. Neher (Ed.). Single-Channel Recording. New York: Plenum Press, 1995, p.483-587
- COUNCIL, N. N. R. Nutrient requirements of dairy cattle. **National Academy Press: Washington D.C.**, v.7, p.381, 2001.
- COZZI, P. G. Metal-salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. **Chemical Society Review**, v.33, p. 410, 2004.



DAI, X.-H., *et al.* Liquiritigenin prevents *Staphylococcus aureus*-mediated lung cell injury via inhibiting the production of alpha-hemolysin. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.15, n.4, p.390-399, 2013.

DELEO, F. R., *et al.* Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, p.18091-18096, 2011.

DHOPLE, V. M., NAGARAJ, R. Conformation and activity of delta-lysin and its analogs. **Peptides**, v.26, p.217-225, 2005.

DINGES, M. M., ORWIN, P. M., SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p.16-34, 2000.

DONG, J., *et al.* Oroxylin A inhibits Hemolysis via hindering the Self-Assembly of alpha-hemolysin heptameric transmembrane pore. **PLoS Computational Biology**, v.9, n.1, p.e1002869, 2013.

DUARTE, D. A., SÁ, A. L. B. Resistência e sensibilidade de cepas do *Staphylococcus aureus* a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos isolados de unidades hospitalares. Revisão bibliográfica sistemática metanalítica dos últimos dez anos. **Revista Eletrônica Acervo Saúde/ Electronic Journal Collection Health**, v.1, p.108-121, 2011.

EL-MASRY, A. H., FAHMY, H. H., ALI ABDELWAHED, S. H. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Benzimidazole Derivatives. **Molecules**, v.5, p.1429-1438, 2000.

ELWARD, A. M., MCANDREWS, J. M., YOUNG, V. L. Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Preventing Surgical Site Infections Following Plastic Surgery. **Aesthetic Surgery Journal**, v.29, p.232-244, 2009.

FRITZ, S. A., *et al.* A serologic correlate of protective immunity against community-onset *Staphylococcus aureus* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v.56, p.1554-1561, 2013.

GAKIAS, S., *et al.* A comparison of the intramolecular hydrogen bonding of N,N'-ethylenebis(aminobenzylidene) in the solid state with its salen analogue. **Journal Molecular Structure**, v.737, p.69, 2005.

GONZÁLEZ, F. H., SILVA, S. C. Introdução à Bioquímica Veterinária. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.198, 2003.

GOUAUX, J. E., *et al.* Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: A heptameric transmembrane pore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.12828-12831, 1994.

GRAY, G. S., KEHOE, M. Primary Sequence Of The Alpha-Toxin Gene From *Staphylococcus Aureus* Wood 46. **Infection and Immunity**, v.46, p.615-618, 1984.

GU, L. Q., *et al.* Stochastic Sensing of Organic Analytes by a Pore-Forming Protein Containing a Molecular Adapter. **Nature**, v.398, p.686-690, 1999.

HARRISON, E. M., *et al.* Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. **EMBO Molecular Medicine**, v.5, n.4, p.509-515, 2013.

HARTENFELLER, M., SCHNEIDER, G. De novo drug design. **Methods in Molecular Biology**, v.672, n.1, p.299-323, 2011.

JARRAHPOUR, A. A., *et al.* Synthesis of Novel Azo Schiff Bases and Their Antibacterial and Antifungal Activities **Molecules**, v.9, p.815-824 2004.

KAT KAR, P., *et al.* Effect of oxindolimine copper(II) and zinc(II) complexes on human topoisomerase I activity. **Metallomics**, v.6, p.117, 2014.

KOLATA, J., *et al.* Distinctive patterns in the human antibody response to *Staphylococcus aureus* bacteremia in carriers and non-carriers. . **Proteomics**, v.11, p.3914–3927, 2011.

KRASILNIKOV OV, TERNOVSKII , V. I., TASHMUKHAMEDOV, B. A. Properties of Conductivity Channels Induced in Phospholipid Bilayer Membranes by Alphastaphylotoxin. **Biofizika**, v.26, p.271-276, 1981.

KRASILNIKOV, O. V., *et al.* Influence of Cys-130 *S. aureus* alpha-toxin on planar lipid bilayer and erythrocyte membranes. **Journal of Membrane Biology**, v.156, p.157-172, 1997.

KRASILNIKOV, O. V., *et al.* Influence of pH on the Potential-Dependence of Staphylococcal Toxin Channels Functioning in Phosphatidylcholine Bilayer. **Ukr. Biokhim. Zh**, v.60, p.60-66, 1988.

KREGER, A. S., *et al.* Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin. **Infection and Immunology**, v.3, p.449-465, 1971.

LEE, K. H., FITTON, J. E., WUTHRICH, K. Nuclear magnetic resonance investigation of the conformation of delta-haemolysin bound to dodecylphosphocholine micelles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.911, p.144-153, 1987.

LOHNER, K., *et al.* Effect of staphylococcal delta-lysin on the thermotropic phase behavior and vesicle morphology of dimyristoylphosphatidylcholine lipid bilayer model membranes. Differential scanning calorimetric, <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectroscopic, and X-ray diffraction studies. **Biochemistry**, v.38, p.16514-16528, 1999.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigations**, v.111, n.9, p.1265-1273, 2003.

LYON, B., SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* genetic basis. **Microbiology Reviews**, v.51, p.88-134, 1987.

MAGALHÃES, C. S., *et al.* A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking of highly flexible ligands. **Information Sciences**, v.289, p.206-224, 2014.

MASSIDDA, O., *et al.* Analysis of the beta-lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Focus on bla complex genes and cadmium resistance determinants cadD and cadX. **Plasmid**, v.55, p.114-127, 2006.

MCDOWELL, L. R. Minerals in animal and human nutrition. **San Diego: Academic Press**, p.524, 1992.

MCNAUGHT, A. D., WILKINSON, A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1997

- MELLOR, I. R., THOMAS, H., SANSOM, M. S. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.942, p.280-294, 1988.
- MERZLYAK, P. G., *et al.* Conductance and Ion Selectivity of a Mesoscope Protein Nanopore Probed with Cysteine Scanning Mutagenesis. . **Biophysical Journal**,, v.89, p.3059-3070, 2005.
- MERZLYAK, P. G., *et al.* Polymeric Nonelectrolytes To Probe Pore Geometry: Application To The Alpha-Toxin Transmembrane Channel. . **Biophysical Journal**,, v.77, p.3023-3033, 1999.
- MORRIS, G. M., *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v.30, n.16, p.2785-2791, 2009.
- MULLIGAN, M. E., *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. **The American Journal of Medicine**, v.94, n.3, p.313-328, 1993.
- NAZARI, M. R., *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review. **Reviews in Medical Microbiology**, v.26, p.1-7, 2015.
- NESTOROVICH, E. M., BEZRUKOV, S. M. Obstructing Toxin Pathways by Targeted Pore Blockage. **Chemical Reviews**, v.112, p.6388-6430, 2012.
- NOSKOV, S. Y., IM, W., ROUX, B. Ion Permeation Through the  $\alpha$ -Hemolysin Channel: Theoretical Studies Based on Brownian Dynamics and Poisson-Nernst-Planck Electrodiffusion Theory. **Biophysical Journal**,, v.87, p.2299-2309, 2004.
- NOVICK, R., BOUANCHAUD, D. Extrachromosomal nature of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.182, p.279-294, 1971.
- NTZIACHRISTOS, L., *et al.* Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. **Part. Fibre Toxicol.**, v.4, p.5, 2007.
- NUNES, C. J., *et al.* Reactivity of dinuclear copper(II) complexes towards melanoma cells: Correlation with its stability, tyrosinase mimicking and nuclease activity. **J. Inorg. Biochem.**, v.149, p.49-58, 2015.
- OHLSEN, K., LORENZ, U. Novel targets for antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v.2, n.6, p.655-666, 2007.
- OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.322, p.207-228, 2008.
- PANTOSTI, A., SANCHINI, A., MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v.2, n.3, p.323-334, 2007.
- POKORNY, A., BIRKBECK, T. H., ALMEIDA, P. F. Mechanism and kinetics of delta-lysin interaction with phospholipid vesicles. **Biochemistry**, v.41, p.11044-11056, 2002.
- POPP, F. D. Synthesis of Potential Antineoplastic Agents. X. Preparation and Reactions of Aldehydes Related to Benzaldehyde Mustard. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.7, n.2, p.210-212, 1964.

PSOMAS, G., *et al.* Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.100, p.1764–1773, 2006.

QIN, W., *et al.* Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. **Molecules**, v.18, p.12264-12289, 2013.

QIU, J., *et al.* Baicalin protects mice from Staphylococcus aureus Pneumonia via inhibition of the cytolytic activity of alpha-hemolysin. **The Journal of Infectious Diseases**, v.206, p.292-301, 2013.

RAGHUNATHAN, G., *et al.* Models of delta-hemolysin membrane channels and crystal structures **Proteins**, v.8, p.213-225, 1990.

RAJALAKSHMI, S., *et al.* Antibacterial activity of copper(II) complexes against Staphylococcus aureus. **The Royal Society of Chemistry**, v.4, p.32004–32012, 2014.

RIT, K. A case report of Small Colony variant of Staphylococcus aureus isolated from a patient with chronic osteomyelitis in a tertiary care hospital of eastern India. **Advanced Biomedical Research** v.3, p.32, 2014.

RODRIGUES, C. G., *et al.* Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors. **Biophysical Journal**, v.95, p.5186-5192, 2008.

ROMERA, S. Complexos de cobre(II) e oxovanádio(IV) com bases de Schiff Quirais: preparação, caracterização e alguns ensaios catalíticos. p.126f, São Carlos : UFSCar, 2007.

SANTOS, A. L. S., *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p.413-423, 2007.

SCHNEIDER, G., *et al.* Voyages to the (un)known: adaptive design of bioactive compounds. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.1, p.18-26, 2009.

SILVA, J. F. M., GARDEN, S. J., PINTO, A. C. The chemistry of isatins: a review from 1975 to 1999. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.12, n.3, p.273-324, 2001.

SILVEIRA, V. C., *et al.* Peculiar reactivity of a di-imine copper(II) complex regarding its binding to albumin protein. **Dalton Trans.**, v.42, p.6386-6396, 2013.

SILVEIRA, V. C., *et al.* Binding of Oxindole-Schiff Base Copper(II) Complexes to DNA and its modulation by the ligand. **J. Inorg. Biochem.**, v.105, p.1692-1703, 2011.

SMITH, M. L., PRICE, S. A. Staphylococcus  $\gamma$ -hemolysin. . **Pathol. Bacteriol.** , v.47, p.379-393, 1938.

SONG, L., *et al.* Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v.274, p.1859-1866, 1996.

SORENSEN, J. R. J. Copper Complexes Offer a Physiological Approach to Treatment of Chronic Diseases. **Progress in Medicinal Chemistry**, v.26, p.437–568, 1989.

STEFUREAC, R. I. NANOPORE ANALYSIS OF PEPTIDES AND PROTEINS **Head of the Department of Biochemistry - University of Saskatchewan**, 2012.

TAKEUCHI, T., *et al.* Selective inhibition of human-thrombin by cobalt(III) schiff base complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v.120, p.8555-8556, 1998.

TALBOT, J. C., *et al.* Dynamics and orientation of amphipathic peptides in solution and bound to membranes: a steady-state and time-resolved fluorescence study of staphylococcal delta-toxin and its synthetic analogues. **European Biophysical Journal**, v.30, p.147-161, 2001.

TAPPIN, M. J., *et al.* High-resolution <sup>1</sup>H NMR study of the solution structure of delta-hemolysin. **Biochemistry**, v.27, p.1643-1647, 1988.

TEIXEIRA, L. R., *et al.* Interaction of Heparins and Dextran Sulfates with a Mesoscopic Protein Nanopore. **Biophysical Journal**, v.97, n.11, p.2894-2903, 2009.

THIAUDIERE, E., *et al.* The amphiphilic alpha-helix concept. Consequences on the structure of staphylococcal delta-toxin in solution and bound to lipids. **European Journal of Biochemistry**, v.195, p.203-213, 1991.

TOBKES, N., WALLACE, B. A., BAYLEY, H. Secondary structure and assembly mechanism of an oligomeric channel protein. **Biochemistry**, v.24, p.1915-1920, 1985.

TRISTAN, A., *et al.* Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant staphylococcus aureus. **Journal of Hospital Infection**, v. 65 (suppl. 2) p.105-109, 2007.

ÜNLÜ, A., *et al.* A new lipase as a pharmaceutical target for battling infections caused by Staphylococcus aureus: gene cloning and biochemical characterization. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p.early view, 2015.

ÜNVERA, H., *et al.* Spectroscopic studies, antimicrobial activities and crystal structures of N-(2-hydroxy-3-methoxybenzalidene)1-aminonaphthalene. **Journal of Molecular Structure**, v.737, n.2-3, p.159-164, 2005.

VALEVA, A., *et al.* Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. **J. Biol. Chem.**, v.281, p.26014-26021, 2006.

VERDON, J., *et al.* Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. **Peptides**, v.30, p.817-823, 2009.

WELLOCK, C., ROSS, B. J. An Examination of Lamarckian Genetic Algorithm. **Proceedings of Late Breaking Papers, Genetic and Evolutionary Computation Conference (GECCO)**, p.474-481, 2001.

WILKE, G. A., WARDENBURG, J. B. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n.30, p.13473-13478, 2010.

XIE, J., BOGLIOTTI, N. Synthesis and applications of carbohydrate-derived macrocyclic compounds. **Chem. Rev.**, v.114, p.7678-7739, 2014.

YE, L.-W., ZHOU, J., TANG, Y. Phosphine-triggered synthesis of functionalized cyclic compounds. **Chem. Soc. Rev.**, v.37, p.1140-1152, 2008.

ZORODDU, M. A., *et al.* An Electron Spin Resonance Study and Antimicrobial Activity of Copper(II)-Phenanthroline Complexes,. **Journal Inorganic Biochemistry**, v.63, p.291-300, 1996.

## 9. ANEXOS

- 9.1** Artigo “*BIOSSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS ANALÍTICAS*”, publicado na revista **Química Nova**.

**BIOSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS ANALÍTICAS**

Juliana P. Aguiar, Janilson J. S. Júnior, Dijanah C. Machado, Maria C. A. Melo e Cláudio G. Rodrigues\*

Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife – PE, Brasil

Recebido em 30/12/2014; aceito em 02/02/2015; publicado na web em 30/04/2015

Revisão

STOCHASTIC BIOSENSING BY A SINGLE PROTEIN NANOPORE IN THE DEVELOPMENT OF ANALYTICAL TOOLS. Studies employing a single protein nanopore as a molecular recognition element in the development of analytical devices - biosensors, spectrometers, DNA sequencing - have increased considerably in the last decade. Several studies show the potential of these bionanostructures for future stochastic biosensing technology. Stochastic biosensing is an approach that relies on the observation of individual binding events between analyte molecules and a single receptor. This approach is inherent to the organisms that use a single protein nanopore as a key element to start, manage and maintain the chemical and biophysical processes of living cells. Here, we discuss alpha-toxin as a bacterial exotoxin and prototype of a protein nanopore in real-time detection and characterization of molecules in aqueous systems.

Keywords: alpha-toxin; biosensor; nanopore; stochastic biosensing.

**INTRODUÇÃO**

Na última década a nanobiotecnologia alcançou notáveis avanços no desenvolvimento de dispositivos e métodos analíticos para detecção, identificação, caracterização e quantificação de moléculas; na realização de diagnóstico médico; para o monitoramento ambiental; no controle de qualidade de alimentos; no combate ao terrorismo e controle de potabilidade da água, dentre outras aplicações.<sup>1-4</sup> Nesse contexto estão os processos bioinspirados ou biomiméticos em que se utilizam nanoestruturas biológicas como elemento de reconhecimento molecular para o desenvolvimento de uma classe inovadora de sensores, cujo mecanismo de funcionamento se baseia em nanoporos individuais dotados com a capacidade de biosensoriamento estocástico.<sup>1</sup> O biosensoriamento estocástico é uma abordagem que se baseia na observação de eventos de ligação entre as moléculas individuais de analitos e um único receptor. A denominação estocástico para esse biosensoriamento é atribuída, primeiramente, em relação à série temporal aleatória de flutuações discretas registradas, devido à detecção por um único nanoporo, de cada molécula do analito, portanto, as moléculas são detectadas uma a uma, ou seja, de maneira unitária ou individual. Secundariamente, o mecanismo de detecção ocorre com a entrada aleatória de cada molécula do analito em um único nanoporo, e isto é devido essencialmente à difusão molecular, ou seja, um fenômeno estocástico.<sup>5-7</sup>

Os nanoporos proteicos ou canais iônicos naturalmente encontrados em membranas biológicas são as macromoléculas fundamentais no desencadeamento de vários processos físico-químicos indispensáveis à manutenção da vida. A inerente capacidade destas macromoléculas proteicas de perceberem parâmetros físicos (por exemplo, campo elétrico), reconhecerem espécies químicas (como por exemplo, a acetilcolina) e principalmente selecionarem os elementos químicos (como por exemplo, íons sódio) transferidos entre os meios intra e extracelular, propicia efetivamente a interação célula-célula e célula-microambiente.<sup>8</sup> Em virtude desta versatilidade funcional, os nanoporos proteicos são considerados, atualmente, a principal nanobioestrutura capaz de realizar o biosensoriamento estocástico, portanto, bioinspiradores à exploração como elemento de detecção, quantificação, monitoração

e caracterização de moléculas individuais. No entanto, essa mudança de paradigma requer um incremento significativo na compreensão da física e da química, que governam a interação nanoporo-analito.<sup>9</sup> Conceitualmente, do ponto de vista biofísico, a análise da interação de uma substância com o canal iônico faz com que este altere sua conformação e consequentemente varie sua condutância. Por outro lado, esse tipo de biomimetismo não é fácil por várias razões, pois em alguns casos a ligação da substância no canal iônico induz, do ponto de vista químico, uma alteração conformacional média, portanto, um processo difícil de manter o controle experimental preciso. Além do mais, muitos canais iônicos tendem espontaneamente a variar entre diferentes estados condutores, em resposta ao potencial elétrico.<sup>10</sup> Essas dificuldades foram praticamente superadas com a utilização do nanoporo proteico formado pela exotoxina bacteriana de *Staphylococcus aureus*, a alfatoxina ou alfa-hemolisina ( $\alpha$ -HL).<sup>11-13</sup> O funcionamento deste nanoporo unitário como elemento sensor deve-se ao fato dele ser a única via resistiva em um suporte isolante que separa dois compartimentos contendo soluções eletrolíticas, sendo que em uma delas se coloca o analito. O fluxo de corrente iônica através do nanoporo é alterado de maneira discreta quando ocorre a entrada ou permeação de moléculas individuais do analito no lume aquoso do nanoporo, gerando uma série temporal de flutuações que está correlacionada com a massa e configuração espacial das moléculas analisadas.<sup>11</sup> Devido aos resultados promissores com a alfatoxina, outros nanoporos proteicos também estão sendo aplicados na detecção de inúmeras moléculas, inclusive no sequenciamento de DNA de fita simples (ssDNA);<sup>14</sup> por exemplo, o nanoporo formado pela toxina do *Bacillus anthracis*, utilizado para detectar e quantificar proteínas;<sup>9</sup> o poro formado pela aerolisina, uma toxina derivada de *Aeromonas hydrophila* que também tem sido utilizada como elemento sensor na detecção de proteínas.<sup>15</sup> Recentemente, num esforço de substituir os nanoporos proteicos, surgiram algumas plataformas mais robustas, que utilizam nanoporos sintéticos em materiais sólidos, para detecção de DNA de fita dupla, polinucleotídeos e proteína.<sup>16</sup> Estes nanoporos sintéticos visam eliminar algumas limitações inerentes ao sistema com nanoporos biológicos, mas eles ainda não atingiram o grau de precisão e caracterização física apresentada por seus homólogos proteicos.<sup>2,9,17</sup> Apesar disso, acredita-se que a evolução da organização dessas estruturas nanométricas sintéticas e biológicas em configurações pré-definidas (biossensores, por

\*e-mail: cgabrielcg@pq.cnpq.br