



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Novos aspectos do efeito antibacteriano de galectinas ligantes de lipopolissacarídeo**

**Martin Krähenbühl Amstalden**

**Ribeirão Preto  
2021**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**Novos aspectos do efeito antibacteriano de galectinas ligantes de lipopolissacarídeo**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

**Orientado:** Martin Krähenbühl Amstalden

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Ribeirão Preto  
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Amstalden, Martin Krähenbühl

Novos aspectos do efeito antibacteriano de galectinas ligantes de lipopolissacarídeo. Ribeirão Preto, 2021.

140 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Marcelo Dias Baruffi

1. LPS 2. Galectinas 3. *Escherichia coli*. 4. Antibióticos.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Martin Krähenbühl Amstalden

Título do trabalho: Novos aspectos do efeito antibacteriano de galectinas ligantes de lipopolissacarídeo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador: Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

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

## DEDICATÓRIA

*À memória de minha avó, Maria Cybelle von Ah Krähenbühl.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, pela orientação e por todas as discussões que tangem e extrapolam o ambiente científico. Minha gratidão por ter me aceito em seu grupo e por todos os ensinamentos.

À Ana Lúcia e ao Henrique, secretários do Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia, pelo apoio e por sempre se mostrarem prestativos em ajudar e esclarecer dúvidas.

À minha família: meus pais Maria Alvina Krähenbühl e Domingos Sávio Amstalden e meus irmãos Ignácio Krähenbühl Amstalden e Maria Cecília Krähenbühl Amstalden por todo o carinho e apoio à minha carreira.

Aos meus colegas do Laboratório de Glicoimunologia: Anna Karoline Aguiar Fleuri, Carlos Alessandro Fuzo, Cássia Fernanda Sales de Lima, Fábio Roque Kubata, Júlia Mazarin Pradela, Luisa Mestriner e Thaís Canassa de Leo pela convivência, companheirismo e amizade. Agradeço especialmente ao Carlos, por sua colaboração neste trabalho, e à Karol, pelos ensinamentos e apoio.

Ao Rubens Eduardo da Silva e à LÍlian Cataldi Rodrigues, pelo apoio técnico.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Nonato, por permitir o uso de seu laboratório, e aos colegas e amigos do Laboratório de Cristalografia de Proteínas: Felipe, Iara, Leandro, Luana, Mariana, Marília, Olívia, Pedro, Valquíria e Victor pelos cafés, conversas e ajuda. Agradeço especialmente à Olívia e ao Victor, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia da Costa Darini, por permitir o uso de seu laboratório e ensinamentos, e à Joseane Cristina Ferreira, pela colaboração.

À Tassia Rafaella Costa, pela colaboração e ensinamentos durante minha iniciação científica.

Zu meinen Freunden und Kollegen in der WWU: Dr. Fabian Herrmann, Daniel Dornbusch, Nica Classen und Nicola Knetzger, für die Freundheit, die Kollaboration, und die wunderbare Zeit, die wir gemeinsam in Münster genossen haben.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Torqueti e às colegas do Laboratório de Citologia Clínica, Bianca e Beatriz, pela convivência e companheirismo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), por ter sido minha casa nos últimos 8 anos, e aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos colegas e professores do programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia.

Aos professores Prof. Dr. Zeki Naal e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal por abrirem seu laboratório em um período importante para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Margarida, Obama, Betão, Tosta, Tainá, Willy, Nelson, Kubata, Bu, Tok, Deó, Lesado, Rosa, Kikão, Sarsa, Ouriço, Marina, Mouzarllem, Plínio, Danilo, Fernandinho, Pal, Nádia, Aninha, Ique, Mimi, Fábio, Raquel, André e Nina pelo apoio, conversas e cervejas no decorrer deste trabalho.

Pesquisa desenvolvida com o auxílio dos recursos de HPC disponibilizados pela Superintendencia de Tecnologia da Informacao da Universidade de São Paulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) - Código de Financiamento 133897/2020-6.

## EPÍGRAFE

*“Sanctus Januarius*

*Ó tu, que com dardo de flama  
Partes o gelo da minha alma,  
Para que ela se lance fremente  
Ao mar de sua suprema esperança:  
Sempre mais clara e mais sã,  
Livre na lei mais amorosa –  
Assim exalta ela teus milagres,  
Belíssimo Janeiro!”*

**Friedrich Nietzsche – A Gaia Ciência (1882)**



## RESUMO

AMSTALDEN, M. K. **Novos aspectos do efeito antibacteriano de galectinas ligantes de lipopolissacarídeo**. 2021. 140 f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A resistência bacteriana a antibióticos é um grave problema global de saúde pública que impõe urgência na busca por novos agentes antibacterianos. As galectinas são proteínas que reconhecem glicanas  $\beta$ -galactosiladas, por meio de seus domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD), e participam de diversos processos celulares e moleculares relacionados a doenças infecciosas. Nesse sentido, galectina-4 (Gal-4) e galectina-3 (Gal-3) interagem com a porção O-PS (unidade repetida do antígeno O) do lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O86. Apenas Gal-4, via seu domínio C-terminal (Gal-4C), promove a perda da integridade de membrana e a morte bacteriana de forma semelhante aos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Sabe-se que um dos fatores associados a ação bactericida dos AMPs depende de suas interações com os grupos fosfatos carregados negativamente da porção lipídeo-A do LPS. Este trabalho teve como objetivos a *i*) caracterização do efeito bactericida de Gal-4 em *E. coli* O86 frente a mecanismos antimicrobianos conhecidos e de resistência a AMPs; e *ii*) a análise do impacto de Gal-4 ou Gal-3 na ação bactericida de antibióticos conhecidos. A viabilidade de *E. coli* O86 selvagem (O-PS<sup>+</sup>) e mutante *ΔwaaL* (O-PS<sup>-</sup>) tratadas com galectinas em associação ou não com antibióticos [ampicilina (Amp), polimixina-B (PmB) e ciprofloxacino (Cipro)] foi determinada através de contagem de unidades formadoras de colônias. A influência da reação de Fenton intracelular no efeito bactericida de Gal-4 foi avaliada utilizando-se 2,2'-bipiridina (agente quelante) e tioureia (agente antioxidante). O impacto das galectinas nas membranas destas bactérias foi avaliado por microscopia de força atômica. A análise *in silico* do potencial mecanismo molecular da ação bactericida de Gal-4C foi feita a partir de um modelo de membrana de *E. coli* O86 e por simulações de dinâmica molecular. As condições testadas de resistência aos AMPs foram baseadas no uso dos cátions Mg<sup>2+</sup> (inibe a interação antibiótico/lipídeo-A ou induz a incorporação do grupo fosfato no lipídeo-A) e Fe<sup>3+</sup> (induz a substituição dos grupos fosfato do LPS). Além disso, foram utilizadas *E. coli* O86 O-PS<sup>+</sup> e O-PS<sup>-</sup> transformadas com um plasmídeo contendo o gene *mcr-1* de resistência a PmB (pMQ124-*mcr-1*). Como esperado, Gal-4 provocou uma rápida e drástica redução (~ 95%) de viabilidade em *E. coli* O86 de modo dependente de seu CRD. Este estudo demonstrou que *i*) a ação de Gal-4 foi dependente da concentração inicial bacteriana; *ii*) *E. coli* O86 tratada com Gal-4 apresentou um crescimento microbiano residual, extrusões vesiculares indicativas da perda da integridade de membrana, e formação de macro agregados bacterianos contendo unidades viáveis; e *iii*) a ação de Gal-4 foi parcialmente suprimida pelos mecanismos de inibição da reação de Fenton intracelular. Gal-3 reduziu a viabilidade de *E. coli* O86 somente em altas concentrações e de modo dependente da interação com O-PS. Os achados *in silico* sugeriram que a interação de Gal-4C com a membrana de *E. coli* O86 obedeceu a sequência de eventos termodinamicamente favoráveis composta pelas seguintes etapas: *i*) interação de Gal4C, que possui propriedades anfífilas semelhantemente aos AMPs, com a região O-PS do LPS; *ii*) inserção de uma região hidrofóbica de Gal-4C na porção apolar da membrana externa

bacteriana. Os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 foram independentes da presença de mecanismos de resistência a AMPs em *E. coli* O86. Além disso, Gal-4 e Gal-3 agiram sinergicamente com PmB na bactéria selvagem, mediados por interações com seus CDRs, mesmo na presença de mecanismos de resistência a AMPs; quando adicionadas concomitantemente em *E. coli* O86, Gal-4 e Gal-3 agiram sinergicamente para reduzir a viabilidade bacteriana de forma dependente do reconhecimento de carboidrato. No entanto, a ausência da região N-terminal de Gal-3 aboliu o seu efeito de redução de viabilidade bacteriana, assim como seus efeitos sinérgicos com PmB e Gal-4. Somente uma concentração bactericida de Gal-4 apresentou efeito sinérgico com Cipro. Este trabalho foi pioneiro em demonstrar que as ações antibacterianas de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86 independem da presença de mecanismos de resistência a AMPs, e que estas galectinas agem sinergicamente com outros agentes antimicrobianos. Finalmente, este trabalho poderá cooperar para o melhor entendimento da participação das galectinas na imunidade contra bactérias e gerar novas perspectivas biotecnológicas aplicáveis à terapêutica antibacteriana, baseadas no reconhecimento da porção O-PS do LPS.

Palavras-chave: LPS, Galectinas, *Escherichia coli*, Antibióticos.

## ABSTRACT

AMSTALDEN, M. K. **New aspects of the antibacterial effect of lipopolysaccharide-binding galectins.** 2021. 140 f. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Bacterial resistance to antibiotics is a serious global public health problem that imposes urgency to search for new antibacterial agents. Galectins are proteins that recognize  $\beta$ -galactosylated glycans via their carbohydrate recognition domains (CRD) and participate in several cellular and molecular processes related to infectious diseases. In this sense, galectin-4 (Gal-4) and galectin-3 (Gal-3) interact with the O-PS (O-antigen repeat unit) moiety of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O86. Only Gal-4, via its C-terminal domain (Gal-4C), promotes the loss of membrane integrity and bacterial death in a manner similar to that of antimicrobial peptides (AMPs). It is known that one of the factors associated with AMPs bactericidal action depends on their interactions with the negatively charged phosphate groups from the LPS lipid-A portion. This work aimed *i*) to characterize the bactericidal effect of Gal-4 in *E. coli* O86, considering its known antimicrobial mechanisms and resistance to AMPs; and *ii*) to analyze the impact of Gal-4 or Gal-3 over the bactericidal action of known antibiotics. The viability of wild type *E. coli* O86 (O-PS<sup>+</sup>) and mutant  $\Delta waaL$  (O-PS<sup>-</sup>) treated with galectins associated or not with antibiotics [ampicillin (Amp), polymyxin-B (PmB), and ciprofloxacin (Cipro)] was determined by colony forming units counting. The influence of the intracellular Fenton reaction on the bactericidal effect of Gal-4 was examined using 2,2'-bipyridine (chelating agent) and thiourea (antioxidant agent). The impact of galectins on the membrane of these bacterial strains was analyzed using atomic force microscopy. *In silico* analysis of the potential molecular mechanism of the Gal-4C bactericidal action was performed using an *E. coli* O86 membrane model and molecular dynamics approaches. The conditions of resistance to AMPs were tested based on the use of the cations Mg<sup>2+</sup> (inhibits the antibiotic/lipid-A interaction or induces the phosphate group incorporation into lipid-A) and Fe<sup>3+</sup> (induces phosphate groups substitution on LPS). In addition, *E. coli* O86 O-PS<sup>+</sup> and O-PS<sup>-</sup> transformed with a plasmid containing the PmB-resistance gene *mcr-1* (pMQ124-*mcr-1*) were used. As expected, Gal-4 caused a fast and drastic reduction (~95%) of *E. coli* O86 viability in a manner dependent on its CDR. This study demonstrated that *i*) the Gal-4 action depended on the initial bacterial concentration; *ii*) *E. coli* O86 treated with Gal-4 exhibited residual microbial growth, vesicular extrusions indicative of loss of membrane integrity, and formation of bacterial macroaggregates containing viable units; and *iii*) the Gal-4 action was partially suppressed by inhibitory mechanisms of the intracellular Fenton reaction. Gal-3 reduced *E. coli* O86 viability only when tested at high concentrations, and acted in a manner dependent on the interaction with O-PS. The *in silico* findings suggested that the Gal-4C interaction with *E. coli* O86 membrane fitted a sequence of thermodynamically favorable events that consisted of the following steps: *i*) Gal-4C interaction, which has amphiphilic properties similar to AMPs, with the LPS O-PS region; *ii*) insertion of a hydrophobic Gal-4C region into the nonpolar portion of the outer bacterial membrane. The antibacterial effects of Gal-4 and Gal-3 were independent of the presence of resistance mechanisms to AMPs in *E. coli* O86. Furthermore, Gal-4 and Gal-3 acted synergistically with PmB against this bacteria strain, via their CRDs interaction, even in

the presence of AMP resistance mechanisms; when added concomitantly to *E. coli* O86, Gal-4 and Gal-3 acted synergistically to reduce bacterial viability in a manner dependent on the carbohydrate recognition. However, the lack of Gal-3 N-terminal region abolished its bacterial viability-reducing effect, as well as its synergistic action with PmB and Gal-4. Only a bactericidal concentration of Gal-4 acted in synergy with Cipro. This is the first study to demonstrate that the antibacterial action of Gal-4 and Gal-3 in *E. coli* O86 is independent of the presence of resistance mechanisms to AMPs, and that these galectins act synergistically with other antimicrobial agents. Finally, this work shall help to better understand the participation of galectins in the immunity against bacteria and open new biotechnological perspectives applicable to antibacterial therapy, based on recognition of the LPS O-PS portion.

Keywords: LPS, Galectins, *Escherichia coli*, Antibiotics.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS .....	vi
EPÍGRAFE.....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xviii
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Antibióticos e a busca por novas estratégias antimicrobianas.....	2
1.2. Estrutura e biossíntese do LPS .....	7
1.3. Peptídeos antimicrobianos e polimixinas: atividade bactericida e mecanismos de resistência dependentes do LPS.....	10
1.4. Galectinas e seu papel no controle de doenças bacterianas.....	16
2. OBJETIVO .....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Produção das galectinas humanas recombinantes .....	26
3.2. SDS-PAGE.....	28
3.3. Bactérias .....	28
3.4. Obtenção de <i>E. coli</i> O86 MCR-1 <sup>+</sup> e <i>E. coli</i> O86 $\Delta waaL$ MCR-1 <sup>+</sup> .....	29
3.4.1 Preparo de <i>E. coli</i> O86 e <i>E. coli</i> O86 $\Delta waaL$ eletrocompetentes.....	29
3.4.2. Transformação das <i>E. coli</i> O86 e <i>E. coli</i> O86 $\Delta waaL$ por eletroporação com o plasmídeo pMQ124- <i>mcr-1</i> .....	29
3.5. Condições de crescimento .....	30
3.6. Ensaio de viabilidade.....	31
3.7. Verificação visual da suspensão de <i>E. coli</i> O86 tratadas com Gal-4 .....	32
3.8. Microscopia de campo claro.....	32
3.9. Microscopia de força atômica.....	33
3.10. Ensaio de inibição da atividade bactericida por adição de tiourea e biperidina .....	33
3.11. Verificação da concentração inibitória mínima de polimixina-B.....	34
3.12. Investigação da inserção e interações do domínio C-terminal da galectina 4 (Gal-4C) em modelo de membrana externa de <i>E. coli</i> O86.....	34
3.12.1. Construção dos modelos moleculares da membrana de <i>E. coli</i> O86 e Gal-4C ....	34
3.12.2. Simulação da bicamada pura e interação com Gal-4C .....	37
3.12.3. Simulações SMD .....	37

3.12.4. Análises das trajetórias .....	38
3.13. Caracterização da superfície hidrofóbica e potencial eletrostático de superfície das Gal-4C e Gal-4N.....	38
3.14. Análise estatística .....	39
4. RESULTADOS .....	41
4.1. Produção e caracterização das galectinas .....	41
4.2. Caracterização do crescimento de <i>E. coli</i> O86.....	43
4.3. Caracterização dos efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 em <i>E. coli</i> O86.....	44
4.3.1. Caracterização cinética do impacto de Gal-4 sobre a viabilidade de <i>E. coli</i> O86..	44
4.3.2. Curvas de concentração de Gal-4 e Gal-3 e a influência dos efeitos dessas lectinas na topografia de membrana de <i>E. coli</i> O86 selvagem e $\Delta waaL$ .....	49
4.3.3. Investigação por DM da interação e inserção de Gal-4C em um modelo de membrana de <i>E. coli</i> O86 .....	52
4.3.4. Influência dos mecanismos de resistência a AMPs na ação antibacteriana de Gal-4 e Gal-3 em <i>E. coli</i> O86 .....	62
4.3.5. Influência da reação de Fenton intracelular no efeito bactericida de Gal-4.....	69
4.4. Caracterização do potencial sinergismo de galectinas com agentes antimicrobianos em <i>E. coli</i> O86.....	71
4.4.1. Associação de Gal4 e Gal-3 com PmB em <i>E. coli</i> O86 .....	71
4.4.2. Avaliação do potencial sinergismo de Gal-4 e Gal-3 em <i>E. coli</i> O86.....	75
4.4.3. Caracterização dos efeitos antibacterianos de Gal-3C em <i>E. coli</i> O86 .....	76
4.4.4. Associação de Gal-4 e Gal-3 com ampicilina e ciprofloxacino .....	78
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	90
7. CONCLUSÃO.....	92
8. REFERÊNCIAS .....	94
APÊNDICE .....	115
Soluções.....	115
Meios de cultura .....	117
Antibióticos .....	118
Anticorpos .....	118

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo proposto para o mecanismo de morte provocado por antibióticos bactericidas.	5
<b>Figura 2.</b> Estrutura e domínios do LPS.	7
<b>Figura 3.</b> Biossíntese do LPS.	8
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da PmB.	11
<b>Figura 5.</b> Os sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B e as modificações que promovem no LPS.	14
<b>Figura 6.</b> Classificação das galectinas.	16
<b>Figura 7.</b> Comparação da estrutura do antígeno B humano com O86.	20
<b>Figura 8.</b> Modelo molecular da membrana externa da <i>E. coli</i> O86.	35
<b>Figura 9.</b> Sistema inicial utilizado nas simulações de DM convencional e SMD.	36
<b>Figura 10.</b> Produção e verificação da homogeneidade dos lotes de Gal-4, Gal-3 e Gal-1 recombinantes.	42
<b>Figura 11.</b> Curva de crescimento de <i>E. coli</i> O86.	43
<b>Figura 12.</b> A atividade bactericida da Gal-4 apresenta uma cinética distinta de ampicilina e dependente da concentração inicial de <i>E. coli</i> O86.	46
<b>Figura 13.</b> Incubação de <i>E. coli</i> O86 por 20 horas com Gal-4 provoca a presença de bactérias viáveis acumuladas em extensos aglutinados celulares.	47
<b>Figura 14.</b> O efeito antibacteriano de Gal-4 e Gal-3 em <i>E. coli</i> O86 é dependente da presença do O-PS e a Gal-4 provoca perda de integridade de membrana e formação de extrusões vesiculares.	50
<b>Figura 15.</b> Distribuição das entidades moleculares que formam o modelo de membrana externa da <i>E. coli</i> O86 ao longo da simulação por DM.	53
<b>Figura 16.</b> Modelagem de Gal-4C.	54
<b>Figura 17.</b> Gal-4C interage com o O-PS de <i>E. coli</i> O86 com energias de interação mais favoráveis através de seu CRD.	56
<b>Figura 18.</b> Padronização do modelo de simulação por SMD da aproximação e inserção de Gal-4C na membrana de <i>E. coli</i> O86.	58

<b>Figura 19.</b> A inserção de Gal-4C por simulações SMD foi mais favorável quando sua região hidrofóbica se orienta em direção à membrana de <i>E. coli</i> O86.	59
<b>Figura 20.</b> Os domínios C- e N- terminais da Gal-4 apresentam perfis distintos de hidrofobicidade e potencial eletrostático.	61
<b>Figura 21.</b> Determinação da concentração inibitória mínima e curva de concentração de PmB em <i>E. coli</i> O86.	63
<b>Figura 22.</b> Os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 não são inibidos com a presença de altas concentrações de Mg <sup>2+</sup> .	64
<b>Figura 23.</b> Os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 independem do estado de ativação dos sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B.	66
<b>Figura 24.</b> Atividades antibacterianas de Gal-4 e Gal-3 independem da presença do gene <i>mcr-1</i> .	68
<b>Figura 25.</b> O efeito bactericida de Gal-4 é parcialmente inibido por 2,2'-bipiridina e tiourea.	70
<b>Figura 26.</b> Gal-4 e Gal-3 potencializam, de forma dependente da presença do O-PS, os efeitos bactericidas de concentrações subletais de PmB em <i>E. coli</i> O86 mesmo em condições de resistência à ação de AMPs.	74
<b>Figura 27.</b> Gal-4 e Gal-3 apresentam efeitos sinérgicos na redução de viabilidade de <i>E. coli</i> O86 de forma dependente da presença do O-PS.	75
<b>Figura 28.</b> Produção e verificação da homogeneidade do lote de Gal-3C recombinante.	76
<b>Figura 29.</b> Gal-3C não reduz a viabilidade de <i>E. coli</i> O86 e não apresenta sinergismo com PmB e Gal-4.	77
<b>Figura 30.</b> O efeito bactericida de Gal-4 em <i>E. coli</i> O86 apresenta sinergismo com Cipro.	79



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classes de antibióticos naturais em uso clínico.	3
<b>Tabela 2.</b> Reconhecimento de bactérias por galectinas humanas e seus efeitos antibacterianos associados.	21

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,2'-Bip	2,2'-Bipiridina
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês "Atomic Force Microscopy")
AMP	Peptídeo antimicrobiano (do inglês "Antimicrobial peptide")
Amp	Ampicilina
Anti-B	Anticorpo anti-grupo eritrocitário do tipo B
bar	Bar
c	Centi
C $\alpha$	Carbono alfa
Cipro	Ciprofloxacino
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidrato (do inglês "Carbohydrate Recognition Domain")
Da	Daltons
Dab	Ácido Diaminobutírico
DM	Dinâmica Molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês "Deoxyribonucleic Acid")
D.O. <sub>600nm</sub>	Densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm
DOPE	do inglês "Discrete Optimized Protein Energy"
f	Fanton
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Gal-1	Galectina-1
Gal-3	Galectina-3
Gal-3C	Domínio C-terminal da galectina-3
Gal-4	Galectina-4
Gal-4C	Domínio C-terminal da galectina-4
Gal-4N	Domínio N-terminal da galectina-4
Gal-8	Galectina-8
Gal-9	Galectina-9
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
Glc	Glucose

GlcNAc	N-Acetilglucosamina
IPTG	$\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo
H	Horas
Hz	Hertz
k	Quilo
L	Litro
L-Ara4N	L-4-Aminoarabinose
Leu	Leucina
LB	Meio de cultivo Luria Bertani
Lac	Lactose
log <sub>10</sub>	Logaritmo de base 10
LOS	Lipooligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Mili
M	Molar
MDR	Multidroga Resistentes
MH	Mueller Hinton
MIC	Do inglês “Minimum Inhibitory Concentration”
Min	Minutos
N	Newton
NADH	Forma reduzida do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (do inglês “Nicotinamide Adenine Nucleotide”).
NCTC	National Collection of Type Cultures
n	Nano
O-PS	Polissacarídeo-O (do inglês “O polysaccharide”)
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Pico
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês “Phosphate Saline Buffer”)
pEtN	Fosfoetanolamina
Phe	Fenilalanina
PmB	Polimixina-B
PME	do inglês “Particle Mesh Ewald summation”
PMF	Potencial de Força Média

POPE	Fosfatiletanolamina
POPG	Fosfatidilglicerol
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês “Ribonucleic Acid”)
rpm	Resoluções por minuto
Sac	Sacarose
SD	Desvio padrão (do inglês “Standard Deviation”)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate”)
SMD	Steered Molecular Dynamics
Temed	Tetrametiletenodiamina
Thr	Treonina
Tio	Tioureia
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
V	Volts
W	Watts
WHAM	do inglês “Weighted Histogram Analysis Method”

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\varepsilon$	Épsilon
$\mu$	Micro
$\Phi$	Fi
$\Psi$	Psi
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$^{\circ}$	Graus
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$\text{TM}$	Trademark
$+$	Positivo
$-$	Negativo
$\pm$	Mais ou menos
$>$	Maior
$<$	Menor

## **Introdução**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Antibióticos e a busca por novas estratégias antimicrobianas

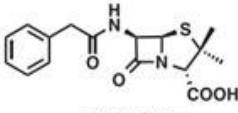
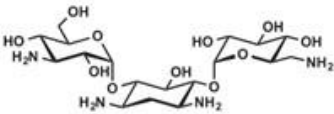
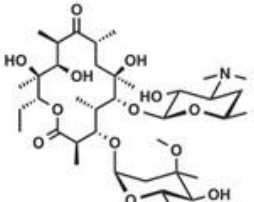
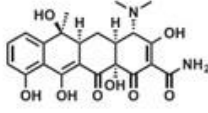
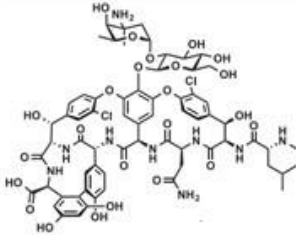
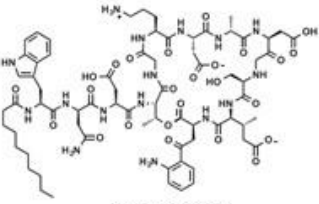
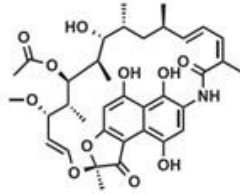
Doenças causadas por microrganismos acompanharam o desenvolvimento da civilização humana desde os tempos mais remotos, moldando acontecimentos históricos, os rumos da tecnologia e da medicina moderna. Com o desenvolvimento do primeiro microscópio, no século XVI, e de métodos de isolamento de microrganismos, no século XVIII, tornou-se possível caracterizar e compreender a relação de causa e efeito de cada um destes organismos em diversas patologias conhecidas (Brachman 2003).

Nessa linha, a descoberta dos primeiros antibióticos e do aperfeiçoamento das vacinas no século XX representaram um passo revolucionário no combate às doenças infecciosas, já que, pela primeira vez, alvos moleculares específicos de microrganismos foram explorados como alvos de agentes farmacológicos e para a montagem de uma resposta imune (Stern e Markel 2005; Brachman 2003). Além disso, através do avanço do complexo industrial da saúde e de técnicas de síntese química e biotecnológicas que acompanharam esse progresso no último século, a produção em larga escala desses agentes se expandiu para a maioria dos países representando, assim, o advento da chamada “Era dos Antibióticos”(Aminov 2010).

Entretanto, ao longo das últimas décadas, múltiplos mecanismos de resistência a esses compostos foram paralelamente desenvolvidos por bactérias que, impulsionados pelas trocas por meio de elementos genéticos móveis, possibilitaram a rápida disseminação de organismos resistentes à maioria das classes de antibióticos conhecidas. De fato, a OMS já reconhece a resistência aos antibióticos como uma das três ameaças mais importantes à saúde pública mundial (“WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014” 2016) e estima-se que, até 2050, infecções causadas por organismos MDR (Multidroga Resistentes) será responsável por 300 milhões de mortes ao ano, com perda líquida de 100 trilhões de dólares para a economia global (Munita & Arias, 2016).

Além disso, apesar da descoberta dos antibióticos ter experimentado uma época de ouro entre os anos 1940 e 1960, principalmente de fontes naturais (Tabela 1), poucas novas classes têm sido de fato descobertos desde então. Sendo de baixa toxicidade a seres humanos e divididos em agentes bactericidas e bacteriostáticos, os antibióticos contribuem com a eliminação do patógeno através de, respectivamente, promoverem a morte direta ou interromperem o crescimento dos microrganismos (Walsh e Wencewicz 2015).

**Tabela 1. Classes de antibióticos naturais em uso clínico.** Anos de introdução no mercado, alvos bacterianos e exemplos estruturais das sete classes mais relevantes de antibióticos naturais. Adaptado de Walsh e Wenciewicz, 2015.

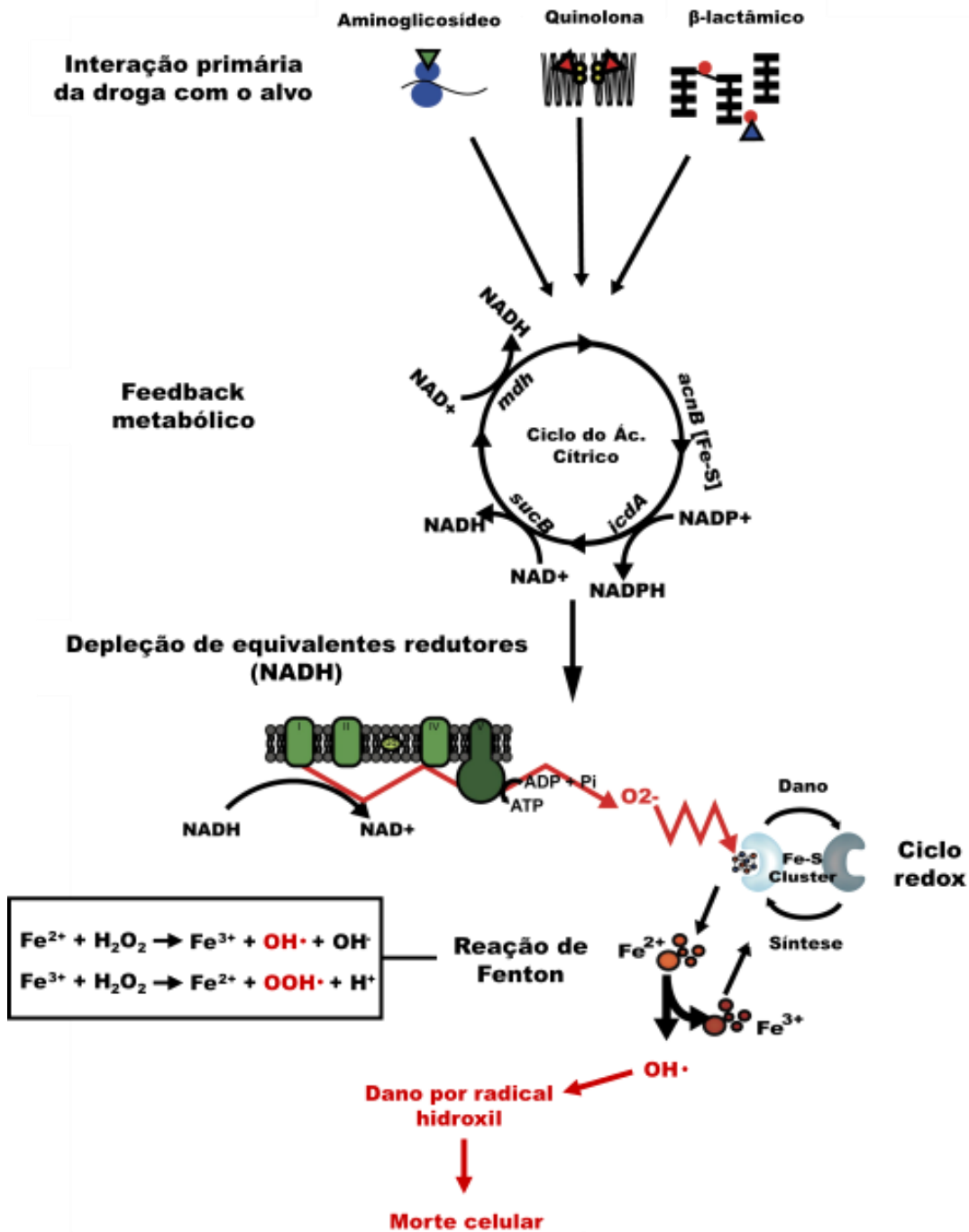
Ano	Classe	Alvo	Estrutura
1940	$\beta$ -lactâmicos	Peptidoglicana	 <p>Penicilina</p>
1950	Aminoglicosídeos	Ribossomo Subunidade 30S	 <p>Canamicina</p>
1952	Macrolídeos	Ribossomo Subunidade 50S	 <p>Eritromicina</p>
1949	Tetraciclínas	Ribossomo Subunidade 30S	 <p>Tetraciclina</p>
1958	Glicopeptídeos	Lípido II	 <p>Vancomicina</p>
2003	Lipopeptídeos	Membrana bacteriana	 <p>Daptomicina</p>
1957	Policetídeos	RNA polimerase	 <p>Rifampicina</p>



Sendo os antibióticos modernos derivados principalmente de fontes naturais e aperfeiçoados por conhecimentos de química medicinal, esses fármacos dividem-se em classes que atuam sobre diversos componentes celulares. Tomando por exemplo as classes de antibióticos derivadas de fontes naturais, atuam desde o processo de tradução bacteriano nas subunidades ribossomais específicas 30S e 50S (aminoglicosídeos e macrolídeos, respectivamente), o processo de biossíntese e dinâmica de reparação de peptídeoglicanas ( $\beta$ -lactâmicos e glicopeptídeos), características intrínsecas da membrana bacteriana (lipopeptídeos e polimixinas) e até sua RNA polimerase específica (policetídeos - Tabela 1).

Apesar dos antibióticos existirem há décadas no mercado, trabalhos recentes propuseram que, apesar de diferentes mecanismos de antibióticos culminarem no que é entendido como efeito bactericida ou bacteriostático, existem correlações metabólicas e efeitos à jusante comuns entre esses fenômenos. Enquanto os efeitos de antibióticos bactericidas resultam na aceleração do processo de respiração celular, o de antibióticos bacteriostáticos resultam na supressão deste processo (Lobritz et al. 2015). Adicionalmente, a adição conjunta de antibióticos bactericidas com antibióticos bacteriostáticos resulta em uma supressão do metabolismo que bloqueia a ação dos agentes bactericidas (Lobritz et al. 2015). Dessa forma, esses trabalhos trazem luz à hipótese de que um estado metabólico à jusante dos efeitos dos agentes antimicrobianos influencia no mecanismo de morte ou inibição do crescimento provocado pelos antibióticos.

Em um mecanismo proposto, os antibióticos bactericidas que atingem diferentes alvos moleculares, invariavelmente induzem o aumento de espécies reativas de oxigênio ligadas à morte celular. Os efeitos provocados pelas interações desses agentes com seus respectivos alvos resultam na oxidação de NADH através da cadeia transportadora de elétrons, com produção de superóxido que, ao interagirem com centros ferro-enxofre de proteínas intracelulares, liberam íon ferroso que reage em uma reação de Fenton intracelular induzindo a produção de radicais hidroxil (Figura 1). Essas espécies reativas de oxigênio altamente danosas às células levam à oxidação de DNA, lipídios e proteínas que acarretam, por fim, a morte celular (Daniel J. Dwyer et al. 2007; Kohanski et al. 2008; 2007; D. J. Dwyer et al. 2014). Entretanto, a essencialidade desse mecanismo em provocar a morte de bactérias ainda é debatida, já que efeitos bactericidas também são observados em ambientes anaeróbicos no qual não haveria possibilidade de produção de tais agentes oxidativos (Keren et al. 2013), apesar destes efeitos serem parcialmente suprimidos nestas condições (D. J. Dwyer et al. 2014).



**Figura 1. Modelo proposto para o mecanismo de morte provocado por antibióticos bactericidas.** As interações primárias entre droga e alvo estimulam a oxidação de NADH através de uma hiperativação da cadeia transportadora de elétrons que culminam na produção de superóxido. O superóxido danifica os centros Fe-S de proteínas intracelulares, liberando íon Fe<sup>2+</sup> que fica disponível para oxidação por meio de reação de Fenton (caixa no canto inferior esquerdo da figura), que por sua vez gera radicais hidroxil. Os radicais hidroxil danificam o DNA, proteínas e lipídeos, resultando em morte celular. Modificado de Kohanski, 2007.

Ainda, apesar de uma possível convergência de eventos à jusante que provocariam a morte após interação do agente antimicrobiano com o alvo primário, bactérias desenvolveram mecanismos de resistência como forma de evitar a ação dos antibióticos em seus respectivos alvos moleculares, através de genes de resistência disseminados por elementos de transferência genética horizontal. Os mecanismos de resistência bacteriana dividem-se em cinco tipos: *i*) modificações da proteína alvo do antibiótico, *ii*) modificações químicas da molécula de antibiótico, *iii*) mudanças nos mecanismos de influxo, *iv*) aumento de mecanismos de efluxo, que diminuem a concentração intracelular dos antibióticos, e *v*) mudanças globais em vias metabólicas importantes por modulação das redes regulatórias. Tais mecanismos são amplamente disseminados, podem coexistir na mesma célula bacteriana e, dependendo de características específicas de espécies ou classificação pelo Método de Gram, alguns são preferidos em detrimento de outros (Munita & Arias, 2016; Walsh & Wencewicz, 2015).

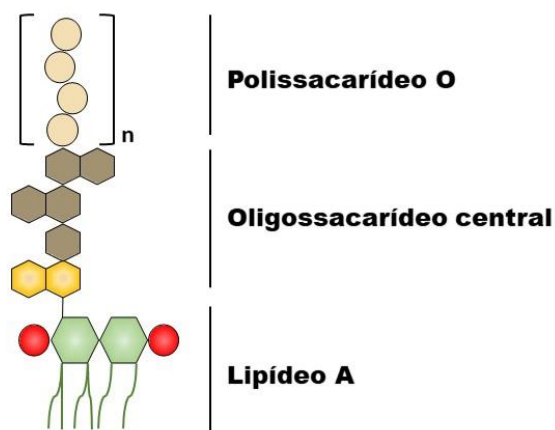
Diante disso, uma das estratégias atuais é a busca de novos alvos terapêuticos ou mecanismos específicos que promovam a morte desses organismos através de processos ou componentes estruturais essenciais de bactérias que, quando atingidos, possam provocar morte de maneira específica. Alguns exemplos de alvos procurados nesse contexto incluem outros elementos da síntese de peptídeoglicanas, responsáveis pela rigidez mecânica das paredes bacterianas (Wright 2007), e elementos de componentes da maquinaria de divisão binária de bactérias (Hsu et al. 2019; den Blaauwen, Andreu, e Monasterio 2014).

Dentro desse contexto, o lipopolissacarídeo (LPS), componente estrutural de gram-negativas, destaca-se como alvo do desenvolvimento de agentes antimicrobianos. Essa molécula é uma estrutura intrinsecamente ligada ao metabolismo geral e fisiologia bacteriana, atua como uma barreira para entrada de antibióticos (May e Grabowicz 2018) e contribui com diversos aspectos da homeostase da membrana externa de bactérias gram-negativas, estabilizando balsas lipídicas e o potencial eletrostático da membrana, além de intermediar o reconhecimento dessas bactérias por outros organismos (Erridge, Bennett-Guerrero, e Poxton 2002). Verificada na década de 70 sua essencialidade para diversas espécies de bactérias, houveram trabalhos que buscaram caracterizar os mecanismos biossintéticos como busca de alvos seletivos para o desenvolvimento de novos antibióticos que inibiriam esses processos (Whitfield e Trent 2014). De toda forma, a presença exclusiva do LPS em bactérias gram-negativas, sua importância na virulência e fisiologia bacteriana, bem como sua essencialidade para diversas espécies conferem a essa molécula como um alvo promissor do desenvolvimento de novas terapias antibacterianas (Whitfield e Trent 2014; May e Grabowicz 2018).

## 1.2. Estrutura e biossíntese do LPS

Em bactérias, os glicoconjugados de maior relevância são a peptídeoglicana, responsável pela arquitetura e rigidez das paredes celulares desses microrganismos, e o LPS. As bactérias são classificadas principalmente em gram-positivas e gram-negativas e cada qual apresenta uma constituição diferente de glicoconjugados no envelope celular. As peptídeoglicanas constituem redes moleculares rígidas entre componentes peptídicos e carboidratos, e estão presentes em camadas das paredes celulares de ambos os tipos - em gram-positivas é mais espessa e externa à membrana enquanto em gram-negativas é fina e inserida no espaço periplasmático, delimitado pelas membranas externa e interna (Juan et al. 2018).

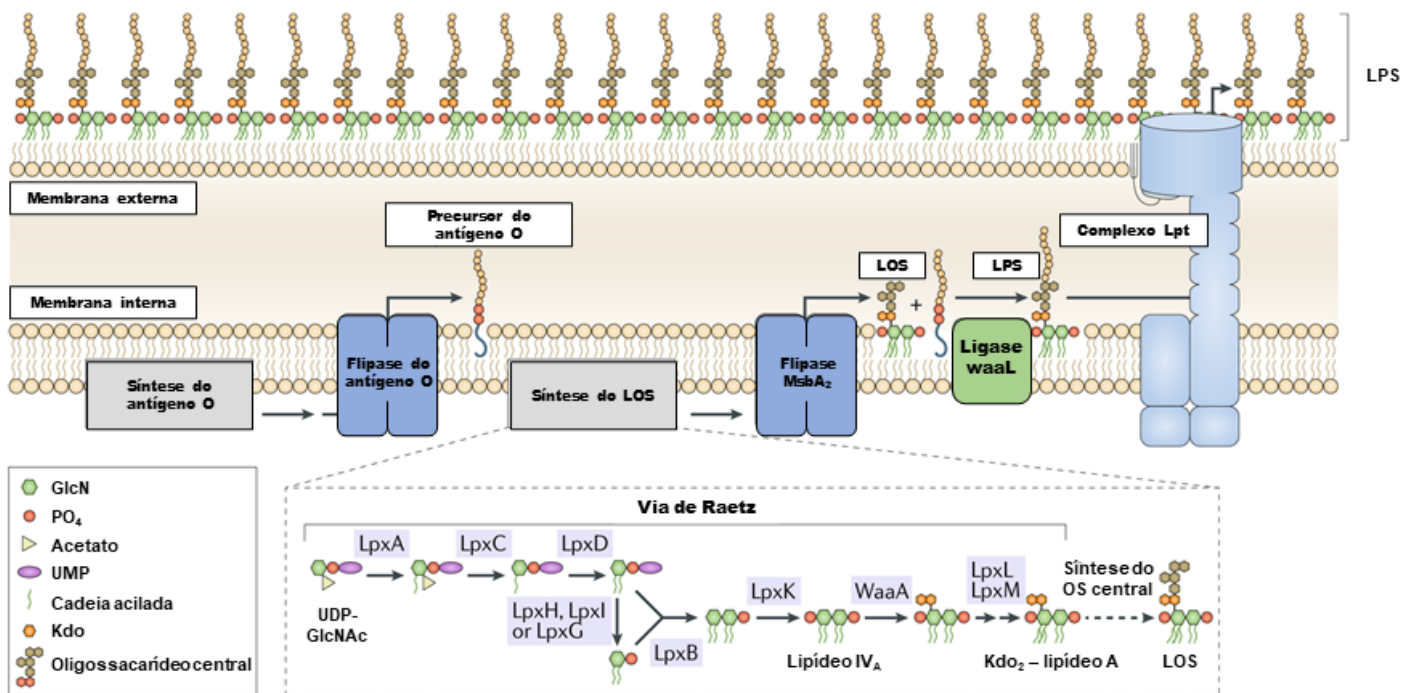
O LPS, por sua vez, é um glicoconjugado exclusivo de bactérias gram-negativas que apresenta natureza anfífilica por conter um componente lipídico, ancorado na membrana externa, e uma porção glicana variável (Figura 2). Estas moléculas são responsáveis tanto para a ação patogênica de bactérias gram-negativas quanto para a arquitetura do envelope e adaptação ao meio em que se encontram e são compostos por três domínios distintos: o lipídeo A, inserido na membrana plasmática e altamente conservado; um oligossacarídeo central que assume poucas variações intra e inter espécies; e o polissacarídeo O (O-PS – do inglês “O-polysacharyde), o principal responsável pela diversidade nas estruturas de LPS. Esse antígeno consiste em um polissacarídeo de domínios repetidos de 4 ou 5 monossacarídeos, podendo apresentar tanto variedade no tamanho das cadeias quanto diversidade na composição até mesmo dentro de uma mesma espécie (Varki et al. 2009; Whitfield e Trent 2014).



**Figura 2. Estrutura e domínios do LPS.** O lipídeo A é a porção que se encontra ancorada na membrana externa de bactérias gram-negativas. O oligossacarídeo central apresenta uma composição pouco variada. O polissacarídeo O, por sua vez, possui uma estrutura altamente variável que caracteriza o sorotipo dos organismos gram-negativos dentro de uma mesma espécie e apresenta uma quantidade de unidades polimerizadas que pode ser distinta mesmo em um único organismo.

Devido aos diferentes padrões de glicosilação e importância desses glicoconjugados para sobrevivência e entendimento dos mecanismos de virulência de bactérias patogênicas, diversos estudos propuseram-se a desvendar as principais rotas biossintéticas que produzem e ligam os domínios distintos de LPS em busca de alvos terapêuticos e específicos de bactérias (Whitfield e Trent 2014; Bodewits et al. 2010). As principais etapas e proteínas que realizam o processo estão representadas na Figura 3.

Enquanto o lipídeo A é sintetizado na face citosólica da membrana interna por meio da Via de Raetz, orquestrando um conjunto de reações bioquímicas realizadas pelas proteínas da família Lpx (Whitfield e Trent 2014), a incorporação do oligossacarídeo central ao Kdo<sub>2</sub> – lipídeo A é atribuída às glicosiltransferases da família Waa, responsáveis pela ligação de unidades sacarídicas ao lipooligossacarídeo (LOS) de maneira relativamente preservada. O produto final é então exportado ao espaço periplasmático, por ação da proteína transmembrana MsbA (Figura 3).



**Figura 3. Biossíntese do LPS.** A biossíntese do lipídeo A e do oligossacarídeo (OS) central ocorre na face citoplasmática da membrana interna. Enquanto a biossíntese do lipídeo A ocorre por meio das proteínas da família Lpx, do oligossacarídeo central ocorre por meio das proteínas da família Waa. Por sua vez, a biossíntese do polissacarídeo O (O-PS) ocorre de maneira separada na face citoplasmática em um carreador lipídico, o undecaprenil pirofosfato. A proteína MsbA e as flipases do antígeno O são, respectivamente, responsáveis pelo transporte do lipooligossacarídeo (LOS) e do precursor do antígeno O da face citoplasmática para a periplasmática da membrana interna. A ligação entre o LOS e o precursor do antígeno O é realizada no espaço periplasmático por meio da ligase waaL. Por fim, o complexo Lpt é responsável pelo transporte do LPS formado para a superfície da membrana externa. Adaptado de Simpson, 2019.

Paralela à biossíntese do LOS, os mecanismos bioquímicos responsáveis pela construção do antígeno O assumem maiores variações inter e intraespecíficas garantindo, assim, a maior variabilidade observada desse domínio do LPS (Inge e Jos 2001). São descritos três mecanismos principais de formação da estrutura que variam nas estratégias de síntese e polimerização do O-PS (Cuthbertson, Kos, e Whitfield 2010). Em comum, apresentam reações iniciais de incorporação de monossacarídeos precursores do metabolismo energético da bactéria e carregados em aceptores, com reações tanto na face citosólica quanto periplasmática da membrana interna. Sendo assim, as etapas finais da biossíntese de LPS concentram-se na ação da enzima ligase waaL, que transfere o O-PS ao LOS, e na exportação da molécula final à membrana externa por meio das proteínas do complexo Lpt (Whitfield e Trent 2014 - Figura 3).

Já que muitas das respostas biológicas provocadas pelas bactérias em organismos hospedeiros são relacionadas ao O-PS, variações presentes na estrutura são intrinsecamente atribuídas à adaptação desses organismos no meio em que se encontram. Além dos chaveamentos específicos de ligações glicosídicas, a polimerização das unidades de O-PS é heterogênea e, assim, resulta na variedade do tamanho das cadeias de polissacarídeos presentes até em uma mesma célula (Hunt 1985). Conseqüentemente, através de modificações quali e quantitativas na expressão de enzimas que realizam as diversas reações de glicosilação do O-PS, foram selecionadas evolutivamente mutações e polimorfismos que permitiram às bactérias se adequarem ao ambiente colonizado tanto para fins de simbiose quanto de infecção (Maldonado, Sá-Correia, e Valvano 2016).

A membrana externa de bactérias gram-negativas, quando formada, possui uma constituição lipídica assimétrica: enquanto a face externa apresenta uma composição majoritariamente de LPS e LOS, a face interna é formada por fosfolipídeos como fosfatidiletinolamina e fosfatidilglicerol (May e Grabowicz 2018; Sohlenkamp e Geiger 2015). Tal composição atua como uma barreira por apresentar uma composição lipídica densa na região ancorada à membrana, e uma carga parcial negativa, presente no lipídeo A e no oligossacarídeo central, que realiza interações com cátions divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  presentes no meio, que estabilizam as moléculas de LPS adjacentes (May e Grabowicz 2018; Rice e Wereszczynski 2018). Além disso, o empacotamento das moléculas de LPS e as pontes salinas garantem propriedades anfífilas importantes para a membrana externa de bactérias gram-negativas, que impedem a entrada de antibióticos para o espaço periplasmático (May e Grabowicz 2018).

### **1.3. Peptídeos antimicrobianos e polimixinas: atividade bactericida e mecanismos de resistência dependentes do LPS**

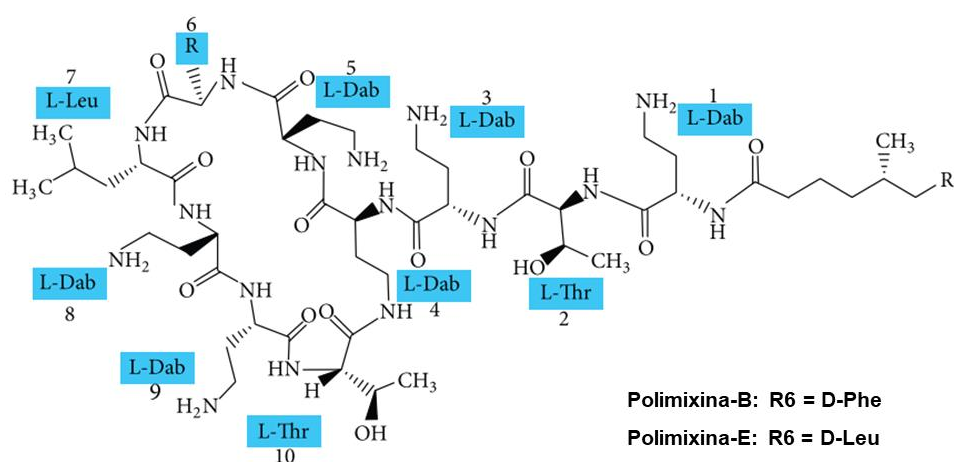
Notavelmente, as propriedades físico-químicas da membrana externa constituída por LPS são as mesmas que tornam essas estruturas para a ação de certos agentes antimicrobianos, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs – do inglês “Antimicrobial Peptides”), produzidos por células teciduais e do sistema imunológico de vertebrados, invertebrados, plantas e até mesmo por bactérias (Bechinger e Gorr 2017). Essas moléculas possuem propriedades anfifílicas importantes, como a presença de cargas positivas e composição lipofílica, tornando-as específicas para a interação com a membrana externa bacteriana de carga parcial negativa (Bechinger e Gorr 2017; Rice e Wereszczynski 2018; Brogden 2005).

Sendo esses agentes divididos em subgrupos baseado em sua constituição de aminoácidos, tamanho e conformação estrutural (Brogden 2005), muitos desses peptídeos apresentam estruturas secundárias importantes que garantem sua atividade antimicrobiana, como hélices  $\alpha$  e folhas  $\beta$  que, aliados com um balanço de aminoácidos básicos (Lisina e Arginina) e hidrofóbicos (Isoleucina, Valina, Felilananina, Tirosina e Triptofano), garantem a especificidade para a interação com o LPS, que por fim levam à morte desses organismos (Bechinger e Gorr 2017; Brogden 2005).

Os modelos e fenômenos que desencadeiam a perda viabilidade bacteriana ainda são debatidos e podem não ser comuns a todos os AMPs (Brogden 2005). Entretanto, etapas sequenciais são necessárias para permitir efeitos à jusante, que iniciam com a interação e inserção do peptídeo na membrana alvo. A interação dos AMPs na superfície da membrana provoca o deslocamento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  que interagem com os fosfatos do lipídeo A e oligossacarídeo central, e por conseguinte a inserção ocorre a partir da região hidrofóbica dos peptídeos entre as cadeias de LPS, interferindo nas interações laterais dos lipídeos e, dessa forma, desestabilizando a homeostase da membrana (Rice e Wereszczynski 2018; May e Grabowicz 2018). A partir dessa inserção, diversos modelos são propostos para a oligomerização destes peptídeos na membrana e formação de poros, como a formação de barris, carpetes e poros toroidais (Brogden 2005), provocando a perda de integridade de membrana e formação de extrusões vesiculares (Kalfa et al. 2001; Brogden 2005; Hollmann et al. 2018). Ainda, são relatados fenômenos à jusante da interação e inserção na membrana externa como inserção e perda do potencial de membrana interna (Z. Yu et al. 2015), interferência na respiração celular (Z. Yu et al. 2015; Subbalakshmi e Sitaram 1998; Brogden 2005) e interferência na síntese proteica e funções celulares (Subbalakshmi e Sitaram 1998; Brogden

2005; C. B. Park, Kim, e Kim 1998), possivelmente por interação com estruturas e moléculas intracelulares como o RNA e DNA (C. B. Park, Kim, e Kim 1998).

Por sua vez, as polimixinas são lipopeptídeos cíclicos não-ribossomais que foram originalmente descobertos em 1947 (Biswas et al. 2012). Dois membros, a polimixina-B e a polimixina-E (colistina), são utilizados na clínica desde a década de 1960 para tratamento de infecções por bactérias gram-negativas, mas com aplicação restrita ou substituída por outros antibióticos, a partir da década de 1970, devido à alta nefrotoxicidade e neurotoxicidade observada após administração parenteral (Biswas et al. 2012; Z. Yu et al. 2015). Porém, o uso de tais antibióticos aumentou a partir da década de 1990 como forma de tratar indivíduos infectados com bactérias MDR, e, desde então, são utilizados como um dos últimos recursos terapêuticos para tratamento de infecções bacterianas (Biswas et al. 2012; Z. Yu et al. 2015). A polimixina-B (PmB) é um lipopeptídeo produzido pelo bacilo gram-positivo *Paenibacillus polymyxa* e sua estrutura é constituída de um heptapeptídeo cíclico, uma cadeia lateral tripeptídica e um ácido graxo no resíduo N-terminal, diferindo da colistina apenas na substituição de uma D-Leucina por uma D-Fenilalanina (Figura 4). Ainda, a PmB apresenta em sua estrutura regiões hidrofóbicas (L-Leu, L-Phe e ácido graxo), assim como resíduos básicos de L- $\alpha$ - $\gamma$ -Dab, que tornam essa molécula policatiônica em pH 7,4 e confere propriedades anfifílicas importantes (Z. Yu et al. 2015).



**Figura 4. Estrutura química da PmB.** A marcação em azul e o número que a acompanha referem-se respectivamente ao resíduo de aminoácido e a ordem de numeração na estrutura. Ainda, a composição do resíduo R6, que diferencia a PmB da colistina, está anotada. Ácido graxo: ácido 6-metiloctanoico ou ácido isooctanoico; Thr: treonina; Phe: fenilalanina; Leu: leucina; Dab: ácido  $\alpha,\gamma$ -aminobutírico, sendo  $\alpha$  ou  $\gamma$  referentes ao respectivo grupo -NH<sub>2</sub> presente na ligação peptídica. Adaptado de Yu et al., 2015.



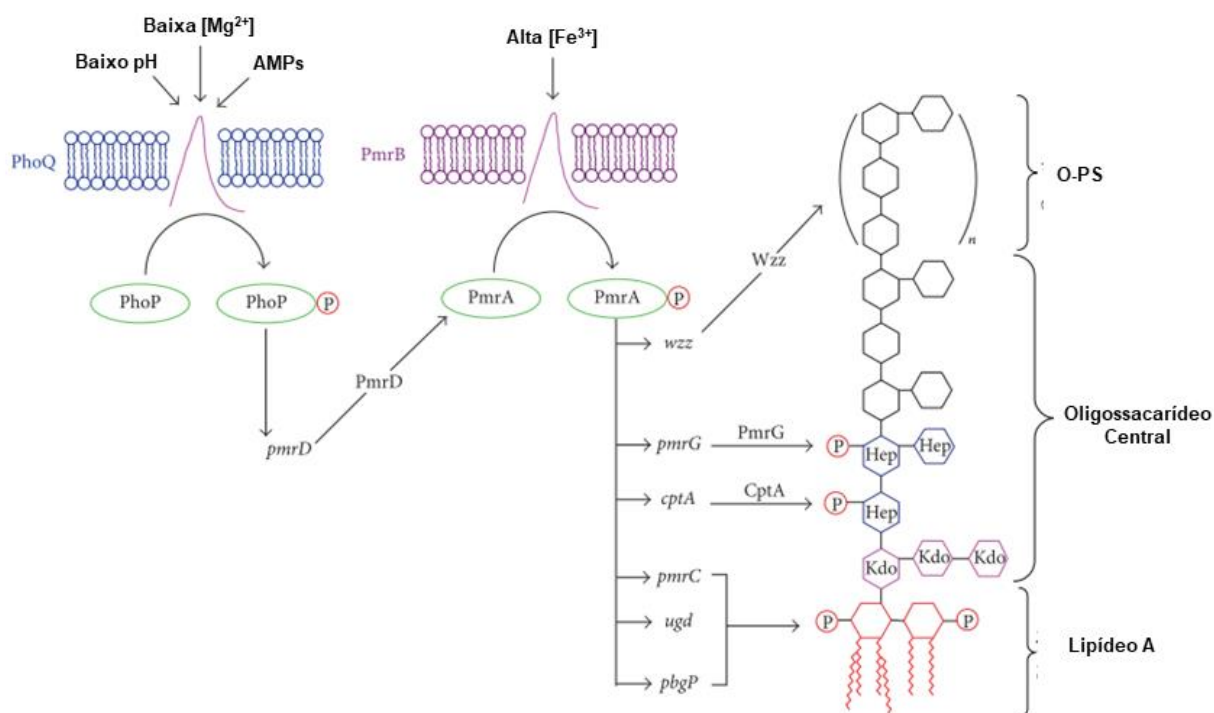
Dessa forma, por apresentar tanto natureza lipofílica e resíduos de carga positiva, a PmB interage e se insere no LPS da membrana externa de gram-negativas tal como os AMPs (Khondker et al. 2019; May e Grabowicz 2018; Rice e Wereszczynski 2018), provocando lise de membrana e morte celular (Z. Yu et al. 2015). Esse fenômeno ocorre por deslocamento dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  sobre a membrana e interação com os fosfatos do LPS através dos grupos  $\gamma$ -amina protonados presentes nos resíduos de Dab da PmB. Ainda, a inserção ocorre logo em seguida por parte da região hidrofóbica da molécula (Khondker et al. 2019; Z. Yu et al. 2015). Nesse processo, o aumento da carga parcial negativa da membrana, assim como o maior empacotamento das moléculas de LPS, respectivamente favorece e desfavorece a interação e inserção da PmB na membrana externa (Khondker et al. 2019). A inserção enfraquece o empacotamento dos lipídeos, aumentando a expansão da monocamada externa (Velkov et al. 2013; Hancock 1997), e assim facilita a formação de áreas desestabilizadas que permitem a PmB em atravessar a membrana externa bacteriana (Powers e Hancock 2003). Quando presente no espaço periplasmático, a PmB interage com os fosfolipídeos da membrana interna, provocando lise desta membrana (Velkov et al. 2010; Hollmann et al. 2018). Adicionalmente, foi observado que a PmB, tal como outros antibióticos bactericidas, também desencadeia a produção de superóxido, deslocamento dos centros ferro-enxofre e reação de Fenton intracelular com produção de radical hidroxil, indicando um fator metabólico associado ao fenômeno de morte provocado por PmB (Imlay 2013; Z. Yu et al. 2015; Kohanski et al. 2007).

Considerando a alta toxicidade observada para tratamentos com PmB na clínica (Biswas et al. 2012), diversos trabalhos procuraram avaliar a associação desse antibiótico com outros agentes antimicrobianos (Hollmann et al. 2018), como forma de reduzir a toxicidade e o surgimento de resistência bacteriana, e de tratar infecções polimicrobianas que não são tratáveis com a administração de uma única droga (Patel e Saravolatz 2006). Devido à capacidade da PmB e AMPs em permeabilizarem a membrana de bactérias gram-negativas, interferindo na sua função de barreira, foram observados sinergismos com antibióticos que agem no citoplasma bacteriano, como a cefalosporina ciprofloxacino, que inibe as topoisomerases II e IV (Hollmann et al. 2018), com azitromicina, potencializando os efeitos desse agente antimicrobiano em bactérias MDR (L. Lin et al. 2015), e com tigeciclina, meropenem e moxifloxacino em *Clostridium difficile*, de forma dependente da capacidade dos AMPs em realizarem a permeabilização de membrana (Nuding et al. 2014). Adicionalmente, foi observado que ampicilina (Amp) possui capacidade de reduzir o potencial de carga de membrana de bactérias, favorecendo a ligação de AMPs e daptomicina, mas não de PmB, na membrana bacteriana

(Sakoulas et al. 2012), sendo que o potencial sinergismo decorrentes da associação entre AMPs endógenos com peptídeos catiônicos como PmB ou colistina ainda é subestimado no tratamento de infecções bacterianas (Hollmann et al. 2018).

Como forma de evitar a atividade bactericida de PmB e AMPs, inúmeros mecanismos de resistência existem em bactérias gram-negativas, que atuam principalmente no impedimento da interação da PmB com a membrana externa bacteriana (Z. Yu et al. 2015). Desde que a PmB foi descoberta na década de 50, foi verificado que os efeitos deste antibiótico depende da interação com a carga da membrana e que a suplementação do meio com cátions divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  protege a bactéria da lise de membrana, possivelmente por reforçar a camada desses íons na superfície da membrana externa bacteriana, dificultando assim a interação da PmB com os grupos fosfato do LPS (Newton 1953; Davis, Iannetta, e Wedgwood 1971). Ainda, foi verificado que a suplementação por  $\text{Mg}^{2+}$  não impede a lise de lipossomos, sugerindo que o efeito protetor desta suplementação poderia evitar a interação da PmB com a membrana interna de bactérias gram-negativas e outros constituintes periplasmáticos (C. C. Chen e Feingold 1972). Entretanto, tal mecanismo é discutível já que a constituição dos fosfolipídeos presentes nos lipossomos pode não mimetizar as interações mais complexas que ocorrem na superfície da membrana externa bacteriana entre o LPS e esses cátions (C. C. Chen e Feingold 1972; Rice e Wereszczynski 2018).

Além disso, as bactérias apresentam mecanismos orquestrados por genes cromossomais que conferem resistência a AMPs e PmB. Em gram-negativas, mecanismos de transdução de sinais simples, como os sistemas de dois componentes, sinalizam para a expressão proteínas que promovem modificações na membrana dessas bactérias e conferem proteção à ação destes agentes antimicrobianos (Simpson e Trent 2019; Z. Yu et al. 2015). Esses sistemas apresentam um sensor quinase transmembrana que detecta a presença de íons e moléculas no espaço periplasmático, promove uma auto-fosforilação em um resíduo de histidina presente em sua face citoplasmática, que por sua vez transfere a fosforilação para um segundo constituinte que, quando fosforilado, regula a expressão gênica (Simpson e Trent 2019). Os sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B são dois dos mais importantes em bactérias gram-negativas, e são responsáveis por promoverem modificações no LPS que protegem da ação de AMPs (H. D. Chen e Groisman 2013; Prost e Miller 2008; Z. Yu et al. 2015; Simpson e Trent 2019 - Figura 5).



**Figura 5. Os sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B e as modificações que promovem no LPS.** PhoP é fosforilado no sistema PhoP/Q em baixas concentrações de  $Mg^{2+}$ , pH e na presença de AMPs ou PmrB, e promove a expressão de PmrD. Esta proteína, ou PmrB em altas concentrações de  $Fe^{3+}$ , fosforilam PmrA que por sua vez leva a transcrição de diversos loci gênicos que promovem modificações no LPS (como Wzz, PmrG, CptA, ugd pbgP e pmrC). A síntese do O-PS é controlada por produtos do gene *wzz*. As proteínas PmrG e CptA são responsáveis por modificações nos fosfatos presentes no em resíduos de heptose (em azul) do oligossacarídeo central, enquanto os fosfatos presentes no lipídeo A podem ser modificados por PmrC com fosfoetanolamina (pEtN), ou por Ugd e PbgP com L-4-aminoarabinose (L-Ara4N). Adaptado de Yu et al., 2015.

O sistema PhoP/Q é ativado principalmente a baixas concentrações de  $Mg^{2+}$ , baixo pH, ou na presença de AMPs, enquanto o sistema PmrA/B é ativado em altas concentrações de  $Fe^{3+}$  e baixo pH. A detecção desses íons e moléculas desencadeiam a auto-fosforilação dos sensores PhoQ e PmrB, que respectivamente fosforilam PhoP e PmrA (Simpson e Trent 2019). A via PmrA/B pode ser ativada de forma independente ou pela via PhoP/Q, já que PhoP, quando fosforilado, promove a expressão de PmrD que conecta as duas vias, podendo ativar o sistema PmrA/B independentemente da autofosforilação de PmrB (Kox, Wösten, e Groisman 2000; Rubin et al. 2015), impedindo ainda a desfosforilação de PmrA (Simpson e Trent 2019). O fator de transcrição PmrA fosforilado promove a expressão de diversos loci gênicos, incluindo Wzz, PmrG, CptA, ugd, pbgP e PmrC (Z. Yu et al. 2015), que são responsáveis por promoverem diversas alterações no LPS (Figura 5). A maioria dessas proteínas promovem alterações nos fosfatos presentes no oligossacarídeo central e no lipídeo A, no qual destacam-se as transferências de fosfoetanolamina (pEtN), por PmrC, e L-4-aminoarabinose (L-Ara4N), por Ugd e PbgP, nos fosfatos do lipídeo A (Z. Yu et al. 2015).

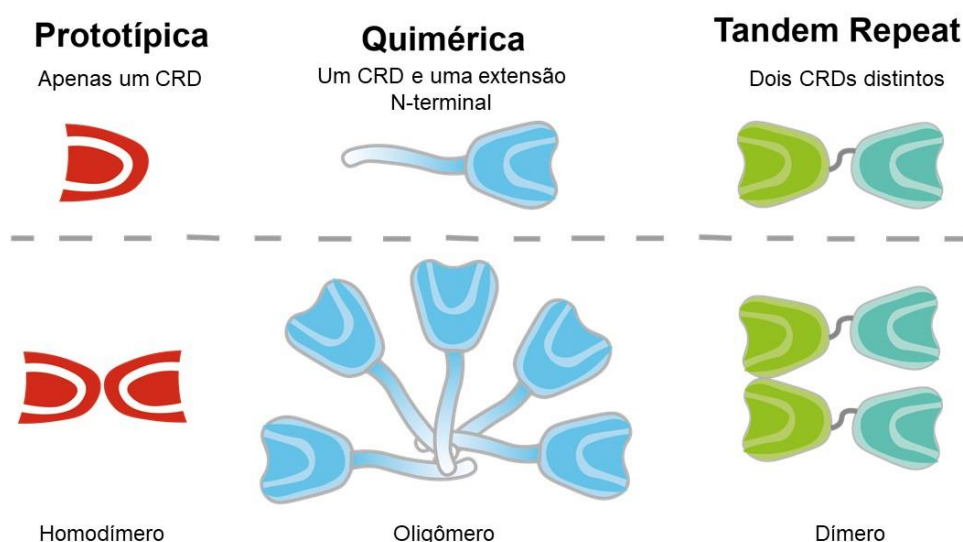
Essas alterações têm capacidade de reformular as dinâmicas de interação laterais do LPS e destas com os cátions divalentes (Rice e Wereszczynski 2018), impedindo a interação e inserção de AMPs e PmB na membrana externa bacteriana (Z. Yu et al. 2015; Simpson e Trent 2019; Poirel, Jayol, e Nordmanna 2017). Ainda, as modificações promovidas por esses sistemas de dois componentes funcionam como fatores de virulência importantes, como a ativação de PhoP/Q em *Salmonella typhimurium* por quantidades micromolares de  $Mg^{2+}$  em fagossomos, protegendo essas bactérias da secreção de AMPs e favorecendo sua infecção no ambiente intracelular (García Véscovi, Soncini, e Groisman 1996).

Como essas vias dependem da ativação de genes cromossomais não-dissemináveis, até então não havia preocupação da comunidade médica quanto à disseminação de genes de resistência à ação de polimixinas, favorecendo, assim, o uso dessa classe de antibióticos para o tratamento de organismos MDR na clínica (Biswas et al. 2012; Z. Yu et al. 2015; Powers e Hancock 2003). Entretanto, esse paradigma mudou em 2015, quando foi descoberto na China um novo gene disseminável em plasmídeos, o *mcr-1* (Liu et al. 2016), que confere a transferência de pEtN no fosfato do lipídeo A independentemente do estado de ativação dos sistemas de dois componentes (Liu et al. 2017) e dificulta a interação da PmB no LPS (Rice e Wereszczynski 2018). Desde então, diversos estudos identificaram a presença de *mcr-1* em amostras clínicas e pecuárias de diversos países (Doumith et al. 2016; Moon et al. 2020; García-Meniño et al. 2019) sendo descritos, até o momento, 10 membros dessa família de genes (Wu et al. 2021).

Dessa forma, novas estratégias de combate a bactérias MDR se fazem necessárias. Ao longo dos últimos anos nosso grupo vem trabalhando com o potencial das galectinas na terapia antibacteriana (Stowell et al. 2010). Foi descrito que alguns membros dessa família de lectinas reconhecem a porção O-PS do LPS de gram-negativas e glicanas de bactérias gram-positivas (Stowell et al. 2014), e provocam a morte específica desses organismos com perda de integridade de membrana (Stowell et al. 2014; 2010). Entretanto, estudos que avaliam o impacto desse fenômeno na terapia antibacteriana ainda são escassos.

#### 1.4. Galectinas e seu papel no controle de doenças bacterianas

As galectinas são lectinas solúveis que caracterizam-se por realizarem interações específicas e reversíveis de glicanas contendo  $\beta$ -galactosídeos (Barondes et al. 1994). Essas lectinas medeiam diversos processos como diferenciação celular e organização tecidual (Leffler et al. 2002), e regulação da homeostase imunológica (Yang, Rabinovich, e Liu 2008; Rabinovich e Toscano 2009), incluindo funções importantes de reconhecimento e controle de patógenos na imunidade inata (Sato e Nieminen 2002; Vasta 2009). São conhecidos 15 membros de galectinas em mamíferos, sendo encontradas tanto em ambiente intracelular quanto extracelular (Stowell, Cummings, e Walker 2015). Além disso, são classificadas de acordo com a disposição e estrutura de seus domínios de reconhecimento de carboidrato (CRDs – do inglês “Carbohydrate Recognition Domain” - Figura 6): *i*) Galectinas prototípicas que apresentam apenas um CRD e existem como monômeros ou homodímeros. Integrantes conhecidos desse grupo são Gal-1, Gal-2, Gal-5, Gal-7, Gal-10, Gal-11, Gal-13, Gal-14 e Gal-15; *ii*) Galectinas quiméricas que apresentam um CRD e uma extensão N-terminal desordenada, cujo único representante conhecido é a Gal-3; *iii*) Galectinas *tandem repeat* que apresentam dois CRDs distintos, um N-terminal e outro C-terminal, conectados por um peptídeo ligador de tamanho variável de 5 a 50 aminoácidos. São integrantes Gal-4, Gal-6, Gal-8, Gal-9 e Gal-12 (Stowell, Cummings, e Walker 2015).



**Figura 6. Classificação das galectinas.** Os três subgrupos de galectinas em relação às estruturas, disposições dos CRD e oligomerização. Adaptado de Stowell, Cummings e Walker, 2015.

A interação das galectinas com seus respectivos ligantes varia dependendo da composição estrutural do carboidrato e da galectina/domínio que realiza a interação (Nio-Kobayashi et al. 2014; Rabinovich e Toscano 2009), sendo que diversas modificações como fucosilação, sialilação e sulfatação nas glicanas afetam a afinidade de interação de galectinas (Stowell, Cummings, e Walker 2015). Ainda, o potencial de oligomerização das galectinas na presença de ligantes desempenha um papel importante em sua função biológica. A partir da oligomerização e da capacidade de ligação nas glicanas por meio de CRDs distintos, como no caso dos membros da grupo *tandem repeat*, as galectinas realizam ligações do tipo homotípica e heterotípica, que, respectivamente, realizam pontes entre glicanas idênticas e distintas, formando microambientes de estruturas complexas contendo essas proteínas com seus respectivos ligantes, sendo esse fenômeno de importância fundamental em suas funções biológicas (Vasta 2009; Di Lella et al. 2011; Vasta et al. 2017).

A galectina-4 (Gal-4) é um membro do subgrupo *tandem repeat* de peso molecular de aproximadamente 36 kDa. Sua estrutura consiste em dois CRDs, um presente no domínio N-terminal e outro no C-terminal conectados por um peptídeo ligador, que apresentam interações distintas com glicanas (Rustiguel et al. 2016). É codificada pelo gene *LGALS4* localizado no cromossomo 19 q13.2, sendo que a sequência de RNA de ~1 kb traduzida é resultado do *splicing* de 9 exons (Cao e Guo 2016; Barondes et al. 1994). Assim como todos os membros da família de galectinas, não é glicosilada e não apresenta peptídeo sinal para transporte via retículo endoplasmático, sendo que sua secreção para o ambiente extracelular ocorre por uma via não clássica (Cao e Guo 2016). Dessa forma, pode ser encontrada tanto em ambientes intracelulares como extracelulares, incluindo a circulação (Leffler et al. 2002), e é constitutivamente expressa no epitélio da mucosa oral, esôfago, intestino e cólon (Huflejt e Leffler 2003). Ainda, a expressão diferencial de Gal-4 ocorre em diversos tecidos sob processos de homeostasia e patológicos como no câncer (Belo et al. 2013; Conde-Rodríguez et al. 2020; Hayashi et al. 2013), inflamação intestinal e na regulação da função de células T (Paclik et al. 2008; Hokama et al. 2004).

Por sua vez, a galectina-3 (Gal-3) é o único membro conhecido do subgrupo quimérico de galectinas em mamíferos, que apresenta um peso molecular de aproximadamente 26 kDa (Barondes et al. 1994). É constituída por um domínio globular C-terminal, que contém o seu CRD, e uma cauda N-terminal desordenada que apresenta aminoácidos *in tandem*, que são essenciais para a função biológica dessas lectinas (Kuwabara e Liu 1996). Apesar da observação inicial da Gal-3 formar pentâmeros por meio de seu domínio N-terminal na presença de ligantes

(Ahmad et al. 2004), a oligomerização desta lectina é complexa e esse conceito é constantemente questionado ou atualizado (Chiu et al. 2020; Lepur et al. 2012; Y. H. Lin et al. 2017). Ainda, a Gal-3 é codificada pelo gene *LGALS3* localizado no cromossomo 14 q22.3 de 6 exons que, após *splicing*, uma fase de leitura aberta de 750 bases é traduzida para o produto final de 250 aminoácidos (Raz et al. 1991; Yuko et al. 1991; Kadrofske, Openo, e Wang 1998). A expressão de Gal-3 é realizada em diversos órgãos e tecidos como o trato digestivo e urogenital (Nio-Kobayashi et al. 2014), pulmões (Nishi et al. 2007), sangue (Yan et al. 2016), rins e coração (Díaz-Alvarez e Ortega 2017) e em células como do sistema imunológico, participando na diferenciação dessas células, na homeostasia e em processos inflamatórios (Li et al. 2008; MacKinnon et al. 2008; Stowell et al. 2008).

Adicionalmente, muitos trabalhos relataram a importância de galectinas em processos infecciosos, tanto favorecendo como desfavorecendo a infecção (Vasta 2009). Essas lectinas podem atuar tanto nas células teciduais e do sistema imunológico no decorrer desses processos (Li et al. 2008; Ferraz et al. 2008; Jenny Almkvist e Karlsson 2002; J. Almkvist et al. 2001), ou pela ligação direta em glicanas de patógenos como vírus (Toledo et al. 2014; Mercier et al. 2008; Ouellet et al. 2005), parasitas (Pelletier e Sato 2002; Kleshchenko et al. 2004), fungos (Fradin, Poulain, e Jouault 2000; Kohatsu et al. 2006) e bactérias (John et al. 2002; Lujan et al. 2018).

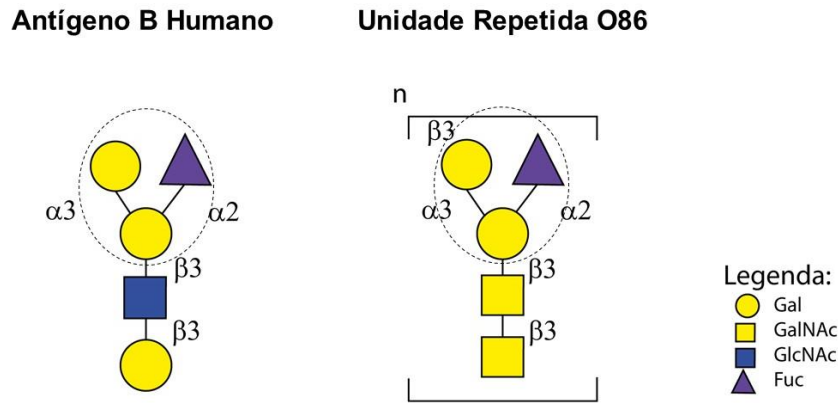
Em relação às bactérias, as funções desempenhadas por galectinas durante o processo infeccioso são inúmeras e multifacetadas, que vão desde a regulação das células do sistema imunológico e funções celulares, ligação e agregação dos patógenos, potencializando ou resolvendo eventos patogênicos. A Gal-3 possui efeitos anti-inflamatórios em macrófagos estimulados por LPS (Li et al. 2008), diferenciando-os para a tipagem M2 (MacKinnon et al. 2008; Ferraz et al. 2008), o que favorece a infecção por impedir a polarização para a resposta do tipo Th1 responsável pelo combate a bactérias intracelulares. Por outro lado, a Gal-3 apresenta efeitos pró-inflamatórios em neutrófilos ativado por LPS (J. Almkvist et al. 2001), ou mesmo ligando-se no LPS como forma de potencializar o processo de ativação de suas funções antimicrobianas (Fermino et al. 2011). Adicionalmente, durante a infecção por *H. pylori* a Gal-3 é exportada do núcleo e atua na ativação de NF- $\kappa$ B e secreção de IL-8, (Subhash e Ho 2016), se liga nessas bactérias evitando sua adesão e seus efeitos de induzir apoptose em células epiteliais gástricas (Subhash, Ling, e Ho 2016), e ainda agrega *H. pylori*, evitando sua entrada nas glândulas gástricas e controlando a infecção (A. M. Park et al. 2016). A Gal-3 pode ainda atuar como uma opsonina em bactérias, facilitando a fagocitose na micróglia (Cockram,

Puigdellívol, e Brown 2019), é diferencialmente expressa nas formas lepromatosa e tuberculóide da lepra (Chung et al. 2013), e possui papel debatido na sepse bacteriana (Fermino et al. 2011; Li et al. 2008). Além disso, a infecção intestinal por *S. enterica* Typhimurium estimula a expressão de galectina-9 (Gal-9) na lâmina própria de macrófagos, estimulando a formação de inflamassomas e clivagem de caspase-1 que culmina na liberação de IL-1 $\beta$ , estimulando a função de macrófagos e sua expressão de Gal-9 em um sistema de feedback positivo (X. Yu et al. 2018). Por sua vez, a expressão de galectina-1 (Gal-1) é aumentada na infecção por *C. trachomatis* e favorece a adesão e internalização bacteriana através da ligação *trans*-heterotípica entre glicanas do patógeno e do hospedeiro, aumentando a taxa de infecção *in vitro* e *in vivo* (Lujan et al. 2018).

Além desses efeitos, um achado surpreendente foi que galetinas também possuem potencial de provocar a morte direta de bactérias através de seu reconhecimento lectínico (Stowell et al. 2014), e o estudo que descreveu o potencial bactericida de Gal-4 e galectina-8 (Gal-8) em *E. coli* O86 foi o primeiro a ter caracterizado esse fenômeno (Stowell et al. 2010).

A bactéria *Escherichia coli*, encontrada principalmente no intestino de vertebrados de sangue quente, apresenta mais de 180 variantes de antígeno O, que, junto ao antígeno K responsável pela cápsula e o antígeno H do flagelo, compõem seus principais marcadores de sorotipagem (Orskov e Orskov 1977; Whitfield e Trent 2014; Varki et al. 2009). Muitos trabalhos associam a influência de marcadores sorotípicos na virulência dessas bactérias, conhecida por assumir relações tanto comensais como infecciosas com seus hospedeiros (Gritsenko & Bukharin, 2000). Nos estudos de caracterização das variantes do antígeno O de *E. coli*, notou-se que o sorotipo O86 possui capacidade de estimular a produção de anticorpos anti-grupo eritrocitário do tipo B humano (Springer, Horton, & Forbes, 1959), sendo essa observação muito discutida como hipótese da presença dessas bactérias estimularem a produção desses anticorpos em indivíduos com sangue do tipo A e O (Springer e Horton 1969). Ainda, a estrutura do O-PS deste sorotipo, posteriormente determinada, evidenciou a região em comum entre ambas as glicanas (Andersson, Carlin, Leontein, Lindquist, & Slettengren, 1989 - Figura 7), evidenciando um mimetismo molecular para evasão da imunidade adaptativa de indivíduos com sangue tipo B devido à deleção de anticorpos autorreativos (Yi et al. 2005; Feng et al. 2005).





**Figura 7. Comparação da estrutura do antígeno B humano com O86.** Tracejado indica a região Gal  $\alpha$ -3 (Fuc  $\alpha$ -2) Gal de atividade do antígeno eritrocitário humano do tipo B.

Nesse contexto, foi identificado que Gal-3, Gal-4 e Gal-8 reconhecem especificamente o grupo sanguíneo do tipo B e o O-PS de *E. coli* (Stowell et al. 2010), nas quais Gal-4 e Gal-8 promovem a morte direta desta bactéria via reconhecimento lectínico sem a necessidade de ativação do sistema complemento e demais mecanismos microbicidas da imunidade inata, sendo que também não provocaram a lise de eritrócitos do tipo B (Stowell et al. 2010). Gal-4 e Gal-8 são membros do grupo *tandem repeat* e foi demonstrado que o reconhecimento em *E. coli* O86 ocorre por meio dos dois CRDs, o efeito bactericida ocorrendo, porém, apenas por meio da interação lectínica do domínio C-terminal. Além disso, a morte observada é rápida e promove o dismantelamento da parede celular bacteriana, conforme demonstrado em vídeos e imagens de microscopia eletrônica apresentadas no artigo. Ainda, quando ausente a unidade de repetição O de *E. coli* O86, por meio da ausência do gene que codifica a ligase waaL, ou quando presentes os carboidratos inibidores lactose ou tiogalactosídeo, não ocorre reconhecimento e morte dessas bactérias (Stowell et al. 2010). Tratando-se de imunidade inata, o fenômeno em questão destaca-se por aliar per si duas características importantes: o reconhecimento específico de glicanas, com capacidade de flagrar uma adaptação de mimetismo molecular, a um mecanismo efetor intrínseco que provoca a morte imediata dessas. Além disso, devido ao perfil de expressão acentuada no epitélio intestinal, acredita-se que essas galectinas possam desempenhar papel importante no controle da microbiota intestinal, agindo de forma rápida e específica sobre bactérias potencialmente virulentas (Stowell et al. 2010; Cao e Guo 2016).

Desde então, diversos trabalhos descreveram o papel do reconhecimento lectínico por parte de galectinas na promoção de morte de diversos patógenos humanos (Stowell et al. 2014; A. M. Park et al. 2016; Sasaki et al. 2020). Foi relatado que Gal-3, que se liga em *E. coli* O86 sem provocar sua morte, tem efeitos bactericidas em *H. pylori* (A. M. Park et al. 2016), assim

como Gal-2 (Sasaki et al. 2020). Ainda, por meio de uma estratégia por *glycan array*, Stowell e colaboradores identificaram diversos patógenos gram-negativos e gram-positivos, que apresentam a determinante de glicana  $\alpha$ -gal, e são reconhecidos e mortos por galectinas (Stowell et al. 2014). No entanto, o reconhecimento não se resume à presença de  $\alpha$ -gal e a lista de bactérias reconhecidas por galectinas humanas, assim como os efeitos antibacterianos devidos a este reconhecimento, se encontra na Tabela 2. Ainda, na última década diversos trabalhos caracterizaram galectinas de animais como equinodermos (Zhang et al. 2020), mexilhões (García-Maldonado, Cano-Sánchez, e Hernández-Santoyo 2017) e insetos (Sreeramulu et al. 2018) com potencial de provocar a morte de patógenos, destacando a importância evolutiva dos efeitos antimicrobianos dessas lectinas na imunidade de organismos que não apresentam imunidade adaptativa (Loker et al. 2004).

**Tabela 2. Reconhecimento de bactérias por galectinas humanas e seus efeitos antibacterianos associados.**

Bactéria	Galectinas	Efeitos identificados			Referências
		Reconhecimento	Bactericida	Bacteriostático	
<i>E. coli</i> O86	-3	Sim			(Stowell et al. 2010)
<i>E. coli</i> O86	-4, -8	Sim	Sim		(Stowell et al. 2010)
<i>P. alcalifaciens</i> O5	-3, -4, -8	Sim	Sim		(Stowell et al. 2014)
<i>K. pneumoniae</i> O1	-3, -4, -8	Sim	Sim		(Stowell et al. 2014)
<i>S. marcescens</i> O20	-4	Sim	Sim		(Stowell et al. 2014)
<i>H. influenza</i>	-8	Sim	Sim		(Stowell et al. 2014)
<i>S. agalactiae</i> (GBS A909)	-8	Sim	Sim		(Stowell et al. 2014)
<i>E. coli</i> O128	-4	Sim			(Stowell et al. 2014)
<i>E. coli</i> O40	-4	Sim			(Stowell et al. 2014)
<i>P. vulgaris</i> O45	-4	Sim			(Stowell et al. 2014)
<i>P. alcalifaciens</i> O6	-4	Sim			(Stowell et al. 2014)
<i>E. coli</i> O55	-4	Sim			(Stowell et al. 2014)
<i>S. pneumoniae</i> type 70	-4	Sim			(Stowell et al. 2014)
<i>P. vulgaris</i> O47	-4	Sim			(Stowell et al. 2014)
<i>K. pneumoniae</i> O8	-4	Sim			(Stowell et al. 2014)
<i>S. enterica</i> O13	-4, -8	Sim			(Knirel et al. 2014)
<i>E. coli</i> O19ab	-4, -8, -9	Sim			(Knirel et al. 2014)
<i>H. pylori</i> Sydney linhagem 1	-3		Sim		(A. M. Park et al. 2016)
<i>S. pneumoniae</i> type 3	-3			Sim	(Farnworth et al. 2008)
<i>N. gonorrhoeae</i> mkC	-3	Sim			(John et al. 2002)
<i>N. gonorrhoeae</i> F62	-3	Sim			(John et al. 2002)
<i>N. gonorrhoeae</i> 1291	-3	Sim			(John et al. 2002)
<i>N. gonorrhoeae</i> 15253	-3	Sim			(John et al. 2002)
<i>N. meningitidis</i> MC58	-3	Sim			(Quattroni et al. 2012)
<i>N. meningitidis</i> Z2491	-3	Sim			(Quattroni et al. 2012)
<i>N. meningitidis</i> 8013	-3	Sim			(Quattroni et al. 2012)
<i>N. meningitidis</i> FAM18	-3	Sim			(Quattroni et al. 2012)
<i>N. meningitidis</i> H44/76	-3	Sim			(Quattroni et al. 2012)
<i>C. trachomatis</i>	-1	Sim			(Lujan et al. 2018)
<i>S. pneumoniae</i> type 1	-1, -3	Sim			(Nita-Lazar et al. 2015)
<i>S. pneumoniae</i> type 14	-1, -3	Sim			(Nita-Lazar et al. 2015)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 19660	-3	Sim			(Gupta et al. 1997)
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> (ATCC 15702)	-3	Sim			(Kavanaugh et al. 2013)
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> (ATCC 15697)	-3	Sim			(Kavanaugh et al. 2013)
<i>H. pylori</i> (ATCC 43504)	-2	Sim	Sim		(Sasaki et al. 2020)

Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desse fenômeno e das semelhanças que apresenta com outros mecanismos bactericidas conhecidos, como a indução de radical hidroxil por meio da indução da reação de Fenton intracelular (Kohanski et al. 2007), e com mecanismos de resistência bacterianos. Considerando que, em patógenos gram-negativos, os alvos de ligação de galectinas estão majoritariamente presentes na determinante O-PS do LPS desses organismos (Stowell et al. 2014; 2010; S K Gupta et al. 1997), e os efeitos bactericidas de galectinas provocam perda de integridade de membrana (Stowell et al. 2010; A. M. Park et al. 2016), de forma semelhante a AMPs e polimixinas (Velkov et al. 2010; Kalfa et al. 2001), é possível que esses efeitos sejam dependentes dos mecanismos de resistência a AMPs e sejam inibidos por alterações no lipídeo A. Ainda, o impacto da associação dessas galectinas com outros agentes antimicrobianos utilizados na clínica até o momento não foi investigada.

Seguindo nessa linha, e devido à singularidade desse fenômeno ainda pouco explorado pela literatura, nós nos questionamos se essa relação entre lectinas e glicanas pode oferecer uma plataforma de estudo inovadora para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas contra bactérias, sendo fonte de possíveis mecanismos ainda não explorados pelas vias antibióticas convencionais. Neste trabalho, nós adotamos a *E. coli* O86 como um modelo para caracterizar a interação de galectinas no O-PS, devido a esse organismo ser reconhecida por Gal-4 e Gal-3, que respectivamente provoca e não provoca sua morte, e a associação dessas lectinas com outros agentes antimicrobianos. Ainda, o LPS é um alvo evolutivamente preservado nas bactérias e de grande importância, principalmente no que tange à resistência a AMPs e polimixinas.

Sendo assim, este trabalho se propõe a caracterizar o efeito bactericida Gal-4 sobre essas bactérias, a construir um modelo de interação por dinâmica molecular como suporte para investigação desse fenômeno, e ainda avaliar o impacto da ligação de Gal-4 e Gal-3 ao O-PS no mecanismo de resistência a AMPs e da associação dessas lectinas com outros agentes antimicrobianos. Entendemos que é de interesse clínico a identificação de mecanismos de ação não contemplados pelos antibióticos atuais e, portanto, este trabalho torna-se importante tanto para a exploração biotecnológica e terapêutica desses componentes do sistema imunológico quanto para o entendimento da importância do LPS como alvo de reconhecimento e ação biológica nestes organismos.

## **Objetivo**

## **2. OBJETIVO**

Caracterizar o efeito bactericida de Gal-4 frente a mecanismos conhecidos e de resistência a AMPs e o impacto da associação de Gal-4 e Gal-3 na atividade de outros agentes antimicrobianos.

## ***Materiais e Métodos***

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A lista de reagentes e soluções utilizados no desenvolvimento deste trabalho se encontra na seção “Apêndice”.

#### 3.1. Produção das galectinas humanas recombinantes

As produções das galectinas humanas recombinante utilizadas neste trabalho, galectina-1 (Gal-1), galectina-3 (Gal-3), galectina-4 (Gal-4) e a forma truncada da galectina-3, que apresenta somente o domínio C-terminal contendo o CRD (Gal-3C), foram realizadas em sistema procarioto de *Escherichia coli*, sendo: *i*) Gal-4: cepa Rosetta transformadas com o vetor pET-28 contendo o fragmento gênico referente à fase aberta de leitura do gene da Gal-4 humana (*LGALS4*); *ii*) Gal-3: cepa BL21 transformadas com vetor contendo o fragmento gênico referente à fase aberta de leitura do gene da Gal-3 humana (*LGALS3*); *iii*) Gal-1: cepa M15 transformadas com o vetor PQU-50 contendo o fragmento gênico referente à fase aberta de leitura do gene da Gal-1 humana (*LGALS1*) e *iv*) Gal-3C: cepa Rosetta-pLysS-DE3 transformadas com o plasmídeo pET-29<sup>a</sup>(+) contendo o fragmento gênico referente aos nucleotídeos 432 a 753 da sequência do gene da Gal-3 humana (*LGALS3*). Estas bactérias foram armazenadas em freezer -80 °C em estoques de glicerol 25% até o momento do uso. A estratégia de purificação das galectinas, adotada para todas as preparações, foi por afinidade lectínica específica com uso de coluna de  $\alpha$ -lactose-agarose (Sigma-Aldrich).

Inicialmente foram inoculados 20  $\mu$ L dos respectivos estoques de suspensões bacterianas em tubos cônicos com 10 mL de meio LB estéril suplementados com os seguintes antibióticos: *i*) Gal-4: canamicina (25  $\mu$ g/mL) e cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL); *ii*) Gal-3: ampicilina (50  $\mu$ g/mL); *iii*) Gal-1: canamicina (25  $\mu$ g/mL) e cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL) e *iv*) Gal-3C: canamicina (25  $\mu$ g/mL) e cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL). As suspensões foram incubadas em agitador orbital a 180 rotações por minuto (rpm) e 37 °C por 16 horas. Após esse tempo, as suspensões foram diluídas na proporção de 1:100 em *erlenmeyers* de 2 L com 500 mL de meio LB suplementados com as respectivas soluções de antibióticos, e estes colocados em agitador orbital a 180 rotações por minuto (rpm) e 37 °C até a leitura da Densidade Óptica 600 nm ( $D.O._{600nm}$ ) atingir valor próximo a 0,45.

A indução da expressão das galectinas foi realizada com o uso de IPTG ( $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo de isopropilo, do inglês “Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside”) e incubação em agitador orbital a 180 rpm. As condições foram: *i*) Gal-4: 100  $\mu$ M de IPTG e

incubação a 25 °C por 24 horas; *ii*) Gal-3: 500 µM de IPTG e incubação a 37 °C por 4 horas; *iii*) Gal-1: 500 µM de IPTG e incubação a 37 °C por 4 horas e *iv*) Gal-3C: 250 µM de IPTG a 37 °C por 3 horas. Passado o tempo, os volumes foram centrifugados a 4 °C a 6000 x g por 10 minutos, concentrados em um único *pellet* para cada preparação de bactérias, e armazenados em freezer -80 °C.

Os *pellets* foram descongelados em banho de gelo e em solução de lise contendo PBS (do inglês “Phosphate Saline Buffer” - Tampão Fosfato Salino) + β-mercaptoetanol (14 mM), e suplementada com lisozima (100 µg/mL), RNase (10 µg/mL), DNase (10 µg/mL) e 1 tablete de inibidor de protease/10mL (Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche Diagnostics). Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas com pipeta de bulbo, armazenadas em gelo por 40 minutos, sonicadas em 8 ciclos contínuos de 30 segundos a 40 W com intervalos de 40 segundos e posteriormente centrifugadas a 10000 x g e 4 °C por 40 minutos.

Os sobrenadantes dos lisados bacterianos brutos foram adicionados em coluna com resina de afinidade α-Lactose-Agarose (Sigma Aldrich), pré-equilibrada com PBS adicionado de 14 mM de β-mercaptoetanol (tampão de lavagem). O material não ligado foi coletado e readicionado à coluna. A lavagem foi realizada com 10 volumes de tampão de lavagem e a eluição com o mesmo tampão, acrescido de 100 mM de α-lactose. Foram coletadas frações de 1,0 mL em microtubos de 1,5 mL e as concentrações foram aferidas em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher – Waltham, MA, EUA) a 280 nm com a aplicação dos seguintes parâmetros: *i*) Gal-4:  $\epsilon/1000 = 37,60$  e MM = 35,94 kDa; *ii*) Gal-3:  $\epsilon/1000 = 35,97$  e MM = 26,15 kDa; *iii*) Gal-1:  $\epsilon/1000 = 8,40$  e MM = 14,78 kDa e *iv*) Gal-3C:  $\epsilon/1000 = 9,97$  e MM = 16,16 kDa.

As frações de concentração igual ou maior a 0,5 mg/mL foram reunidas, divididas em alíquotas e armazenadas em freezer -80 °C até o momento do uso. O armazenamento de galectinas na presença de lactose e β-mercaptoetanol, respectivamente seu carboidrato hapteno específico e um agente redutor, garantem a preservação de sua atividade e possibilitam o armazenamento em freezer. A α-lactose e o β-mercaptoetanol foram removidos das amostras de galectinas purificadas com auxílio de coluna de exclusão molecular (PD10 *Desalting column*, GE Healthcare) pré-equilibrada com PBS, e as frações coletadas monitoradas em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher) e esterilizadas por filtração com o uso de membranas de 0,22 µM.



### 3.2. SDS-PAGE

Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS – do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate”) e agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol foi realizado como forma de definir o grau de homogeneidade das preparações de galectinas purificadas. O gel foi preparado na proporção de 30:8 (m/m) de acrilamida/bis-acrilamida, Tris-HCl 125 mM e SDS 0,1%, cuja polimerização foi iniciada pela reação entre persulfato de amônia (0,5% m/m) e tetrametiletilenodiamina (Temed – 16 mM). O gel preparado foi composto por duas fases com concentrações de polimerização distintas: um gel superior de empacotamento a 5% e um gel inferior de separação a 12%. As amostras aplicadas ao gel foram solubilizadas em tampão de amostra desnaturante e redutor de proteínas. Como referência de massa molecular foi utilizada uma mistura de proteínas padrão com massas moleculares conhecidas (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific). A corrida eletroforética foi realizada com uma fonte Electroforesis Power Supply EPS 601 (GE Healthcare) com corrente fixa de 20 mA e voltagem 300 V por 2 horas ou até que as amostras atingissem ~ 1,0 cm do final do gel. Em seguida, os géis foram corados com solução de azul brilhante por 60 minutos e descorados a trocas sucessivas com solução aquosa e aquecimento.

### 3.3. Bactérias

As linhagens de *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$  (ligase<sup>-</sup>) que, respectivamente, expressam e não expressam a unidade de repetição O com atividade do grupo eritrocitário humano do tipo B em seu LPS, foram cedidas pelo professor Dr. Sean Stowell da Emory School of Medicine Atlanta – Georgia (EUA). A linhagem *E. coli* NCTC 13846 foi adquirida comercialmente através da Controllab (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os estoques das linhagens foram preparados por meio do isolamento de colônias em meio de cultivo Ágar MH (Mueller-Hinton), para crescimento de inóculos isolados em meio LB até a fase estacionária. Estas suspensões bacterianas foram então adicionadas em proporção 1 : 1 em solução LB adicionado de 50% glicerol e armazenadas em freezer -80 °C até o momento do uso. A presença do antígeno O no LPS de *E. coli* O86, alvo da ligação de Gal-4 e Gal-3, ou a ausência desse carboidrato em *E. coli* O86  $\Delta waaL$  foi avaliada por meio de ensaio de perda de viabilidade na presença de Gal-4. A verificação da resistência intrínseca da *E. coli* NCTC 13846 à polimixina-B (PmB) foi realizada por meio da aferição da concentração inibitória mínima deste antibiótico para a bactéria.

### **3.4. Obtenção de *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* O86 $\Delta$ waaL MCR-1<sup>+</sup>**

Como forma de obtermos as formas de *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta$ waaL que apresentem o gene *mcr-1* de resistência à ação de PmB e AMPs, nós transformamos essas bactérias com o plasmídeo pMQ124 contendo o gene *mcr-1* (pMQ124-*mcr-1*), gentilmente cedido pelo prof. Dr. Yohei Doi da University Pittsburgh School of Medicine – Pittsburgh (EUA). A estratégia adotada foi o preparo de *E. coli* O86 e *E. coli* O86  $\Delta$ waaL eletrocompetentes e a transformação dessas bactérias com o plasmídeo por ensaio de eletroporação, por meio de protocolo adaptado de Sambrook (Sambrook e Russell 2006).

#### **3.4.1 Preparo de *E. coli* O86 e *E. coli* O86 $\Delta$ waaL eletrocompetentes**

*E. coli* O86 e *E. coli* O86  $\Delta$ waaL foram inoculadas por 16 horas a 37 °C em tubos cônicos de 50 mL contendo 10 mL de meio LB. Após este tempo, 2 mL de cada suspensão foram adicionados em *erlenmeyer* de 1 L contendo 150 mL de meio LB suplementado com 1,5 mL de solução de glucose a 20% e os frascos foram colocados em *shaker*, incubados a 200 rpm e 37 °C, até que a leitura da D.O.<sub>600nm</sub> atingisse valor próximo a 0,4. Posteriormente, cada suspensão foi colocada em gelo e centrifugada em um tubo cônico de 50 mL a 4000 x g e 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido, adicionando-se um novo volume da suspensão sobre o *pellet*, até que todo o volume presente no *erlenmeyer* ficasse concentrado neste *pellet*. As células foram então lavadas com solução de glicerol 10%, adicionando-se inicialmente 10 mL desta solução para ressuspensão do *pellet*, com auxílio de uma pipeta de bulbo, para então adicionar mais 40 mL da solução e centrifugar a 4000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido mais três vezes até que o *pellet* restante fosse ressuspendido em 300  $\mu$ L de glicerol 10%, a suspensão dividida em microtubos de 1,5 mL em alíquotas de 100  $\mu$ L, e esses tubos armazenados imediatamente em freezer a -80 °C.

#### **3.4.2. Transformação das *E. coli* O86 e *E. coli* O86 $\Delta$ waaL por eletroporação com o plasmídeo pMQ124-*mcr-1***

A transformação por eletroporação foi realizada nas *E. coli* O86 e *E. coli* O86  $\Delta$ waaL eletrocompetentes preparadas. Estas bactérias foram inicialmente retiradas do freezer -80 °C e descongeladas em gelo. Foram então adicionados 1  $\mu$ L da solução de 40 ng/ $\mu$ L do plasmídeo pMQ124-*mcr-1* ou H<sub>2</sub>O como controle, e 100  $\mu$ L de cada suspensão foram adicionados em cubetas de eletroporação. A eletroporação foi realizada por meio do programa Ec1 do

eletroporador MicroPulser (Bio-Rad – Hercules, EUA) em voltagem de 2,5 kV. Após este processo, foram adicionados imediatamente 900 µL de meio LB e as suspensões foram incubadas em *shaker* por 45 minutos a 37 °C e 200 rpm. Decorrido este tempo, foram inoculados 100 µL das suspensões sobre placas com meio LB ágar, suplementado ou não com gentamicina (50 µg/mL), e estas foram incubadas por 16 horas a 37 °C. De placas com meio LB suplementado com gentamicina, advindas de amostras transformadas com o plasmídeo pMQ124-*mcr-1*, colônias isoladas foram inoculadas em tubos cônicos de 50 mL contendo 10 mL de meio LB suplementado com gentamicina (50 µg/mL) e PmB (1 µg/mL), e estes tubos foram incubados em *shaker* por 16 horas a 37 °C e 200 rpm. As suspensões resultantes de *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$  transformadas com pMQ124-*mcr-1* (respectivamente *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup>) foram adicionadas em proporção 1 : 1 em solução LB adicionado de 50% glicerol e armazenadas em freezer a -80 °C até o momento de uso.

### 3.5. Condições de crescimento

A padronização das condições de crescimento das bactérias para realização dos experimentos seguintes foi obtida através da aferição de curvas de crescimento como forma de obter a correlação entre UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL) e D.O.<sub>600nm</sub>, conforme descrito anteriormente (Arthur, Cummings, e Stowell 2015). Brevemente, 20 µL de alíquotas de *E. coli* O86 armazenada em freezer -80 °C a glicerol 25% foram inoculadas em 1 mL de meio LB em tubos cônicos de 15 mL e estes incubados 37 °C e 180 rpm por 16 horas. Passado esse tempo, 100 µL foram inoculados em 10 mL de meio LB em tubo cônico de 50 mL e incubados a 37 °C e 180 rpm, sendo a D.O.<sub>600nm</sub> monitorada até atingido valor próximo a 0,45. Em seguida, 100 µL dessa suspensão foram inoculadas em 50 mL de meio LB em Erlenmeyer de 250 mL e incubadas a 37 °C e 180 rpm. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos, sendo uma parte aferida em espectrofotômetro a 600 nm e outra diluída e plaqueada como forma de obter a correlação entre D.O.<sub>600nm</sub> e UFC/mL para cada tempo. A partir desses dados, os crescimentos bacterianos para os experimentos seguintes foram realizados com a adição de 100 µL de suspensões em fase log em tubos cônicos de 50 mL acrescidos de 10 mL de meio LB, sendo estes monitorados até D.O.<sub>600nm</sub> de ~0,3, correspondente à concentração de  $1,25 \times 10^8$  UFC/mL. Para os experimentos de crescimento de *E. coli* O86 em Mg<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, o meio LB foi suplementado com MgCl<sub>2</sub> (22 mM) ou FeSO<sub>4</sub> (400 µM) no crescimento anterior à realização do experimento. Para os experimentos com *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup>, o pré-inóculo para estas bactérias foi realizado

em meio LB acrescido do antibiótico de seleção do plasmídeo pMQ-124, gentamicina (50 µg/mL), bem como de uma concentração inibitória de PmB (1 µg/mL) para *E. coli* O86, determinada experimentalmente. Os crescimentos das culturas bacterianas das bactérias MCR-1<sup>+</sup> advindas deste pré-inóculo foram realizados em meio LB suplementado com gentamicina (50 µg/mL). Para os experimentos com culturas de *E. coli* O86 crescidas na presença de Mg<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, bem como de *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup> na presença de gentamicina, quando atingida a D.O.<sub>600nm</sub> de ~0,3 as suspensões foram centrifugadas a 4000 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado, e os *pellets* ressuspensos em meio LB, como forma de eliminar a interferência desses agentes nos experimentos.

### 3.6. Ensaio de viabilidade

Os ensaios de viabilidade desenvolvidos foram adaptados de Stowell et al. (2010) e na metodologia descrita em Artur, Cummings e Stowell (2015). Para a determinação das concentrações de unidades viáveis de bactérias, foi realizado ensaio de diluição e plaqueamento em gota (Herigstad, Hamilton, e Heersink 2001; Miles, Misra, e Irwin 1938). Suspensões de *E. coli* O86, *E. coli* O86  $\Delta waaL$ , *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup>, *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* NCTC 13846 a  $1,25 \times 10^8$  UFC/mL tiveram suas concentrações ajustadas por diluição em meio LB e 120 µL dessas suspensões foram adicionadas em tubos de ensaio estéreis com 30 µL de amostras (concentração bacteriana:  $1 \times 10^7$  UFC/mL, a não ser quando indicado) contendo: PBS, Gal-3, Gal-4, Gal-1, Gal-3C, PmB, ampicilina (Amp) ou ciprofloxacino (Cipro), em adições isoladas ou concomitantes, e a diferentes concentrações conforme indicado nos experimentos. As amostras foram incubadas em agitador orbital a 37 °C e 180 rpm por tempos indicados para cada experimento. Após esse período estas foram imediatamente colocadas em banho de gelo, submetidas a vórtex, e 100 µL adicionados em solução de 900 µL (diluição 1 : 10) de PBS + 20 mM de lactose em gelo como forma de cessar o possível efeito bactericida da Gal-4 (Stowell et al. 2010) e de promoção da aglutinação das bactérias por parte da Gal-3 e da Gal-4, sendo esta última fonte de erro na diluição e contagem das amostras (Barbosa et al. 1995; Miles, Misra, e Irwin 1938). As amostras foram então diluídas seriadamente através da adição de 100 µL de suspensão em 900 µL de PBS (1 : 10), sendo submetidas a vórtex entre as diluições. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de limites contáveis de bactérias nas diluições. Para cada diluição, foram retiradas três gotas de 100 µL e adicionadas em placas de petri de 60 x 15 mm com meio Ágar Müller-Hinton (KASVI), colocadas para secagem em fluxo laminar e incubadas em estufa a 37 °C por 12 a 16 horas. Após esse período, as Unidades

Formadoras de Colônia (UFC) de cada amostra foram contadas, sendo consideradas somente as gotas com mínimo de 20 e máximo de 200 colônias para estimativa da concentração bacteriana em UFC/mL, baseando-se, respectivamente, no mínimo de colônias necessárias para se obter confiança considerado o padrão estocástico de distribuição de bactérias na amostra e o total de colônias contáveis para a área referente a uma gota de 100  $\mu$ L (Herigstad, Hamilton, e Heersink 2001). Durante as execuções independentes do mesmo experimento, a ordem das amostras que eram imediatamente diluídas e plaqueadas após retiradas do agitador eram diferentes dos experimentos anteriores como forma de minimizar a possível interferência da incubação com lactose em gelo. Os resultados experimentais foram expressos na concentração absoluta de UFC/mL em base  $\log_{10}$  ou porcentagem relativa a controles tratados com PBS para cada tempo.

### **3.7. Verificação visual da suspensão de *E. coli* O86 tratadas com Gal-4**

Tubos de ensaio contendo *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$ , isoladas ou em suspensão mista de proporção de O86 10 : 1  $\Delta waaL$  (concentração final das suspensões  $1 \times 10^6$  UFC/mL), foram tratadas com Gal-4 ou PBS por 20 horas a 37 °C e 180 rpm. Após este tempo, foi verificada a saturação das suspensões resultantes, sendo considerado como resultado positivo e negativo respectivamente as suspensões saturadas e não saturadas após este período de crescimento.

### **3.8. Microscopia de campo claro**

Como forma de analisar aspectos macroscópicos de suspensões bacterianas, microscopia de campo claro de amostras incubadas por 20 horas com PBS ou Gal-4 foi realizada. Após o tratamento, 50  $\mu$ L de amostras foram colocadas em lâmina de microscópio, cobertas com lamínulas e levadas para análise em microscópio. Os dados foram obtidos para campo claro e exportados com as respectivas escalas.

### 3.9. Microscopia de força atômica

A avaliação da topografia da membrana de *E. coli* O86 quando submetidas a tratamentos com Gal-3 e Gal-4 foi determinada por AFM (do inglês “Atomic Force Microscopy” – Microscopia de Força Atômica).  $1 \times 10^7$  UFC/mL de *E. coli* O86 e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  foram incubadas com PBS, 5  $\mu$ M de Gal-3 e 5  $\mu$ M de Gal-4 por 2 horas a 37 °C e 180 rpm. Passado esse tempo, de cada amostra foram retiradas alíquotas de 100  $\mu$ L para determinação de UFC/mL pelo ensaio de contagem descrito anteriormente, e o restante (1 mL) submetido a uma centrifugação a 6000 x g por 10 minutos e 25 °C. Os sobrenadantes foram retirados, adicionou-se 1 mL de paraformaldeído a 2,5% em PBS e as amostras foram incubadas a 37 °C por 15 minutos. Estas foram submetidas a duas lavagens consecutivas com PBS (6000 x g por 10 minutos), armazenadas em microtubos, e enviadas para análise em microscópio de força atômica na Universidade de Münster, na Alemanha. As análises de AFM foram realizadas em parceria com o Dr. Fabian Herrmann e Daniel Dornbusch, no modo de contato intermitente (Tapping mode®) por meio de um microscópio de força atômica Bruker Dimension 3100, equipado com um controlador Nanoscope-IIIa (Bruker, Karlsruhe, Alemanha) e pêndulos de detecção de sílica (HQ:NSC<sub>14</sub>/Al BS, agulha de raio < 10 nm, constante de mola nominal 5 N/m e frequência de 160 kHz, manufacturados pela  $\mu$ mesh, Sofia, Bulgária). As áreas de interesse foram identificadas no modo de campo claro presente no próprio microscópio e uma amplitude do valor quadrático médio de aproximadamente 2 V e frequência de oscilação de abaixo de 2% da ressonância máxima foi utilizada para taxas de escaneamento de aproximadamente 0.5 Hz.

### 3.10. Ensaio de inibição da atividade bactericida por adição de tiourea e 2,2'-bipiridina

Como forma de verificar a interferência da reação de Fenton intracelular na atividade bactericida de Gal-4 em *E. coli* O86, foi realizado um ensaio de viabilidade desta bactéria na presença de tiourea e 2,2'-bipiridina, que respectivamente atuam como um agente antioxidante para ação de radicais livres e quelante de íons Fe<sup>3+</sup> liberados nos centros de Fe-S de proteínas intracelulares bacterianas (Kohanski et al. 2007). O experimento foi realizado em *E. coli* O86 para tratamentos de 20 minutos conforme descrito na seção 3.6, com a adição de tiourea (5 mM) e 2,2'-bipiridina (125  $\mu$ M), em adições isoladas ou concomitantes com Gal-4 (1  $\mu$ M) e ampicilina (4  $\mu$ g/mL), utilizada como um controle de antibiótico inibido por esses agentes (D. J. Dwyer et al. 2014; Lobritz et al. 2015).

### **3.11. Verificação da concentração inibitória mínima de polimixina-B**

Como forma de obter a concentração inibitória mínima (MIC – do inglês “Minimum Inhibitory Concentration”) de PmB em *E. coli* O86 para selecionar clones resistentes a esse antibiótico durante a transformação desta bactéria com o plasmídeo pMQ124-*mcr-I*, foi realizado ensaio de macrodiluição em caldo com adição de 10 µL de congelado dessas bactérias em tubos cônicos de 50 mL, contendo 10 mL de meio LB adicionados a concentrações crescentes de PmB (0; 0,2; 0,5; 1 e 2 µg/mL). A bactéria *E. coli* NCTC 13846, que apresenta o gene *mcr-I* e é utilizada como um padrão de resistência à ação de PmB (Doumith et al. 2016), foi utilizada como controle. Os tubos foram incubados em agitador orbital a 37 °C e 180 rpm por 20 horas e, após este tempo, a D.O.<sub>600nm</sub> foi averiguada em espectrofotômetro. A partir dos resultados deste experimento a concentração de 1 µg/mL foi escolhida para selecionar clones de *E. coli* O86 e  $\Delta waaL$  transformadas com o plasmídeo pMQ124-*mcr-I*, conforme descrito nas seções 3.4.2. e 3.5.

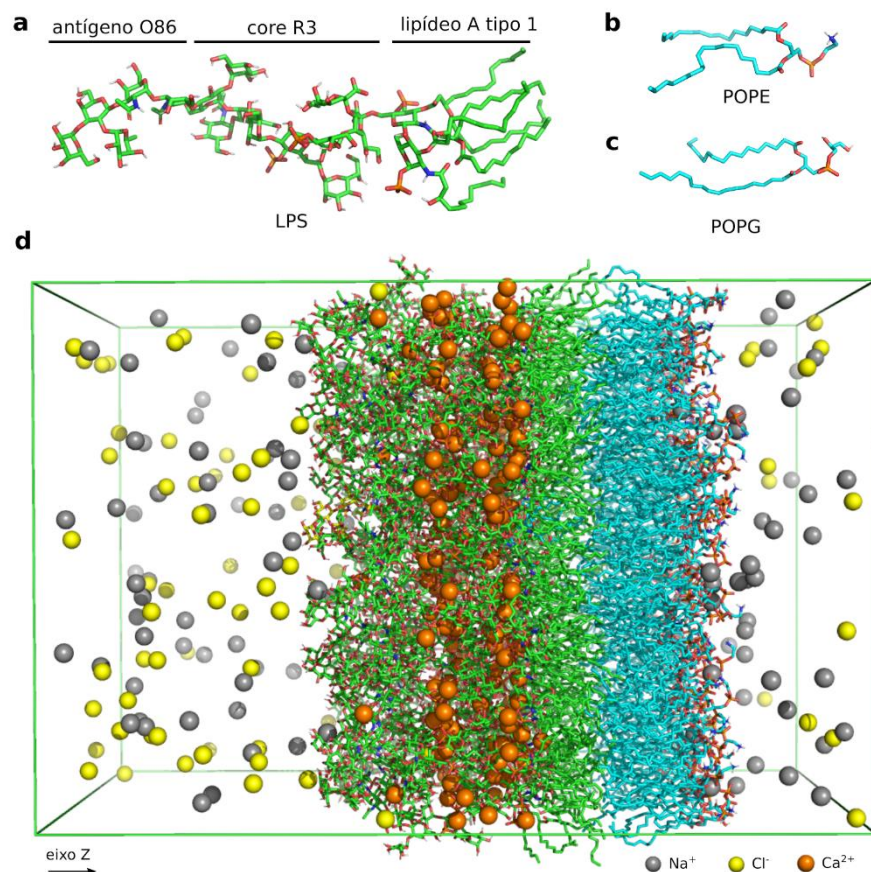
### **3.12. Investigação da inserção e interações do domínio C-terminal da galectina 4 (Gal-4C) em modelo de membrana externa de *E. coli* O86**

A investigação da inserção do domínio Gal-4C na membrana de *E. coli* O86, responsável pela atividade bactericida da Gal-4 nesta bactéria (Stowell et al. 2010), foi realizada empregando técnicas de simulação molecular. A construção do modelo e os experimentos foram realizados em parceria com o pesquisador do nosso grupo de pesquisa, Dr. Carlos Alessandro Fuzo. Para tal finalidade foi construído um modelo de membrana externa da *E. coli* O86 cujas propriedades dinâmicas foram exploradas com simulações por dinâmica molecular (DM). A interação entre a Gal-4C e a membrana modelo foi explorada tanto por simulações convencionais de DM, para observar a aproximação e interação com a superfície da membrana rica em carboidratos, quanto por simulações por DM em situação de não equilíbrio, empregando *steered MD* (SMD), para avaliar a inserção da Gal-4C na membrana.

#### **3.12.1. Construção dos modelos moleculares da membrana de *E. coli* O86 e Gal-4C**

O modelo da membrana de *E. coli* O86 foi construído primeiramente modelando a estrutura do LPS através do serviço *LPS Modeler* no CHARMM-GUI (Jo et al. 2008) e o campo de força CHARMM36 (Huang e Mackerell 2013), que é uma interface web para geração das coordenadas e parâmetros de campos de força. O LPS foi modelado com o lipídeo A

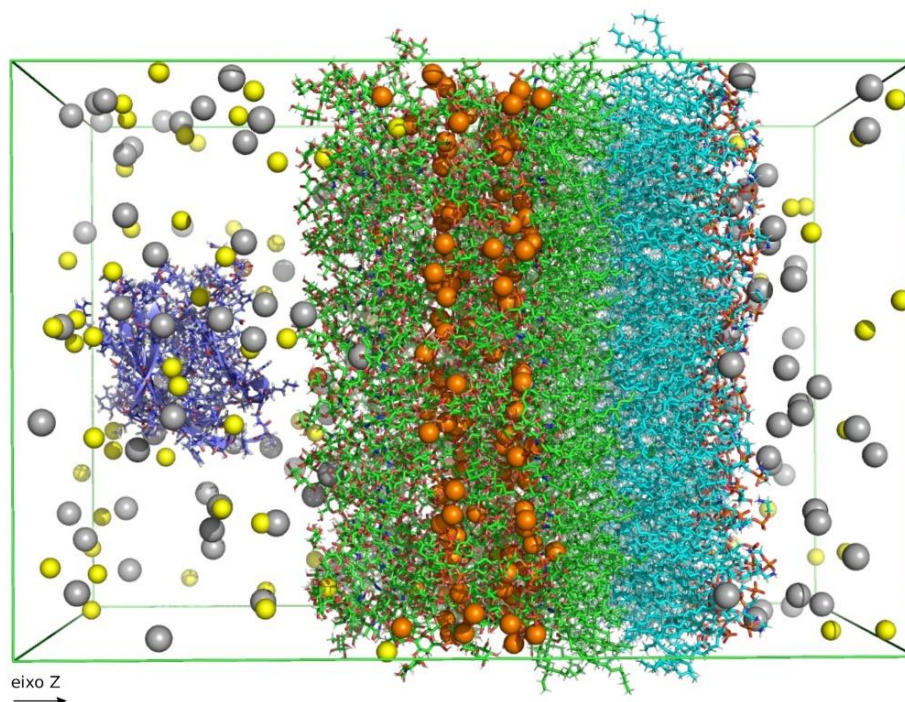
hexaacilado do tipo 1 (Simpson e Trent 2019), oligossacarídeo central do tipo R3 (Han et al. 2012) e 1 unidade do antígeno O86, que é suficiente para a promoção de morte por parte da Gal-4 (Stowell et al. 2010 -Figura 8a). O sistema de dimensões x, y e z respectivamente iguais a 9,85, 9,85 e 15 nm foi construído com o serviço *Membrane Builder* (Lee et al. 2019) do CHARMM-GUI através da inserção de 53 moléculas do LPS modelado formando a camada superior (camada externa) e uma combinação de 136 moléculas de fosfatidiletanolamina (POPE) (Figura 8b) e 34 de fosfatidilglicerina (POPG - Figura 8c) na camada inferior (voltada para o espaço periplasmático) em uma razão POPE:POPG igual a 4 : 1 conforme descrito para a *E. coli* (Sohlenkamp e Geiger 2015). Estas camadas foram inseridas de forma que o plano adotasse uma orientação perpendicular ao eixo z. O sistema foi solvatado com 31683 moléculas de água, as cargas negativas do lipídeo A e oligossacarídeo central foram neutralizadas com íons  $\text{Ca}^{2+}$  (265 íons) e a força iônica de 150 mM foi ajustada pela adição de íons  $\text{Na}^+$  (109 íons) e  $\text{Cl}^-$  (75 íons) (Figura 8d).



**Figura 8 - Modelo molecular da membrana externa da *E. coli* O86.** As estruturas das moléculas de (a) LPS, (b) POPE e (c) POPG são mostradas com a representação de bastões no mesmo esquema de cores presentes no modelo do (d) sistema construído, no qual pode-se observar os íons  $\text{Na}^+$  (cinza),  $\text{Cl}^-$  (amarelo) e  $\text{Ca}^{2+}$  (laranja) representados como esferas. Os limites do sistema são representados pelo paralelepípedo retangular verde e as moléculas de água foram removidas para melhor visualização.



A estrutura cristalográfica da Gal-4C humana foi obtida no *Protein Data Bank* (Berman et al. 2000) com código 5CBL (Rustiguel et al. 2016). Dentre as 4 cadeias (A, B, C e D), presentes na unidade assimétrica, foi escolhida a cadeia B (resíduos 184 até 323) que tem mais resíduos resolvidos estruturalmente. As coordenadas desta cadeia foram extraídas e os heteroátomos foram removidos. A sequência de resíduos da extremidade N-terminal de 176 até 183 (sequência SEFLPTME) e S230 não resolvidos na estrutura cristalográfica foram inseridos com o programa Modeller (Šali e Blundell 1993). A validação das estruturas modeladas foi realizada a partir da análise do gráfico de Ramachandran construído com o programa PROCHECK (Laskowski et al. 1993), no qual a disposição da maioria dos resíduos (> 98%) em regiões favoráveis e permitidas indicam um enovelamento adequado e dentro do esperado para estruturas proteicas. O sistema inicial para as simulações de DM convencional e SMD foi construído a partir da membrana equilibrada por DM, seguindo a metodologia que será descrita adiante, inserindo a Gal-4C na região do solvente próxima à face formada pelas moléculas de LPS da membrana com a região de ligação a carboidratos (CRD) voltada para o antígeno O86 (Figura 9).



**Figura 9 - Sistema inicial utilizado nas simulações de DM convencional e SMD.** A Gal-4C é mostrada pela representação esquemática das estruturas secundárias e os átomos como bastões (azul) e as outras moléculas seguem o mesmo padrão de representação e esquema de cores da Fig. 8d.

### 3.12.2. Simulação da bicamada pura e interação com Gal-4C

As simulações foram realizadas com o programa GROMACS versão 2019 (Abraham et al. 2015) com aceleração GPU no cluster multiusuário da Superintendência da Tecnologia da Informação da USP-SP em um servidor com 16 Cores Intel(R) Xeon(R) E5- 2680 @ 2.70GHz, 2 placas nVidia Tesla K20m e 128 GB RAM. Os lipídeos, proteína e íons foram modelados com o campo de força CHARMM36 (Huang e Mackerell 2013) e as moléculas de água com os parâmetros do modelo TIP3P (Jorgensen et al. 1983). As energias dos sistemas construídos foram primeiramente minimizadas aplicando o algoritmo *steepest descent*. Posteriormente, os sistemas foram submetidos à simulação por DM aplicando restrições translacionais a partir do uso de uma função potencial harmônica com constante de força igual a  $1000 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$  nos átomos pesados (todos exceto hidrogênio) das moléculas de lipídeo e, quando presente, na Gal-4C por 100 ps. Após a equilibração, as simulações moleculares convencionais para avaliar o comportamento da membrana pura e também observar a aproximação de Gal-4C sobre a face da membrana contendo LPS (simulação em triplicata) foram realizadas sem restrições para as posições atômicas por 100 ns. A simulação de cada uma das triplicatas no estudo de aproximação da Gal-4C foi realizada aplicando diferentes distribuições iniciais de velocidades atômicas (a 310,15 K) para garantir diferentes trajetórias no espaço amostral. Nas simulações SMD foram aplicadas restrições para manter a geometria da Gal-4C e nos lipídeos para manter a integridade da membrana, que serão detalhadas na próxima seção. A temperatura em 310.15 K e pressão de 1 bar foram controlados pelos termostato e barostato de Berendsen utilizando um acoplamento semi-isotrópico na pressão (Berendsen et al. 1984). As interações foram calculadas dentro de um raio de corte de 1.0 nm com aplicação do método PME (do inglês “Particle Mesh Ewald summation” - Darden, York, e Pedersen 1993) no cálculo das interações eletrostáticas de longo alcance. As equações de movimento foram integradas com o algoritmo *leap-frog* (Hockney, Goel, e Eastwood 1974) aplicando intervalo de tempo de integração de 2 fs. As oscilações das ligações com átomos de hidrogênio dos solutos foram restringidas com o algoritmo LINCS (Hess et al. 1997) e a geometria das moléculas de água foram mantidas utilizando o algoritmo SETTLE (Miyamoto e Kollman 1992).

### 3.12.3. Simulações SMD

O método SMD, implementado no código *pull* do GROMACS versão 2019, foi utilizado para caracterizar a aproximação e inserção da Gal-4C na face de LPS do modelo de membrana da *E. coli* O86. As simulações SMD foram realizadas utilizando como sistema inicial as

coordenadas equilibradas que foram geradas a partir da dinâmica com restrições do sistema contendo a Gal-4C. Foram realizadas 10 simulações SMD com diferentes distribuições iniciais de velocidade a 310,15 K, conforme descrito anteriormente, puxando a Gal-4C na direção da membrana com uma mola (potencial harmônico) com constante de força igual a  $500 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$  na direção z, perpendicular à face da membrana, a uma velocidade constante de  $0.001 \text{ nm.ps}^{-1}$  por aproximadamente 15 a 20 ns. O componente z da distância entre os centros de massa da Gal-4C e da membrana foi tomado como referência para a determinação da coordenada de reação. Para garantir a manutenção da integridade da estrutura da Gal-4C foram aplicadas restrições de distâncias entre pares de átomos de carbono  $\alpha$  ( $C\alpha$ ) dos resíduos 11 ao 148. A integridade da membrana foi mantida aplicando restrições espaciais a partir de um potencial harmônico com constante de força igual a  $1000 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$  nos átomos de fósforo das moléculas de lipídeo na direção z, conforme descrito na literatura (Thai, Theodorakis, e Li 2020).

#### **3.12.4. Análises das trajetórias**

As análises das estruturas e trajetórias foram realizadas com as ferramentas do GROMACS 2019 e as figuras foram geradas com o pacote *ggplot2* (Wickham 2016) do R (R Core Team, 2019) e *Pymol* (Schrodinger 2010).

#### **3.13. Caracterização da superfície hidrofóbica e potencial eletrostático de superfície das Gal-4C e Gal-4N**

As estruturas das galectinas foram obtidas a partir do PDB com os códigos Gal-4C (PDB: 5CBL) e Gal-4N (PDB: 4XZP). As estruturas utilizadas para os cálculos foram preparadas removendo os heteroátomos e incluindo resíduos/átomos ausentes nas estruturas cristalográficas utilizando o programa *Modeller* (Webb e Sali 2016). A razão entre a superfície não polar e polar como também o potencial eletrostático de superfície foram calculados com o programa *protein-sol patches* (Hebditch e Warwicker 2019). As representações gráficas sobre as estruturas da Gal-4C e Gal-4N foram geradas com o programa *Pymol* (Schrodinger 2010).

### 3.14. Análise estatística

Os resultados foram representados através da média e desvio padrão (SD). Para comparação de grupos múltiplos utilizou-se a análise de variância bidirecional (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, inclusive para a verificação da potencialização/inibição através da adição conjunta de dois agentes, no qual os controles isolados são comparados conjuntamente com o tratamento duplo. Para diferenças de valores de dois grupos diferentes foi realizado o teste T de Student. As análises foram realizadas através do software Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de  $P$  igual ou menor a 0,05.

## **Resultados**

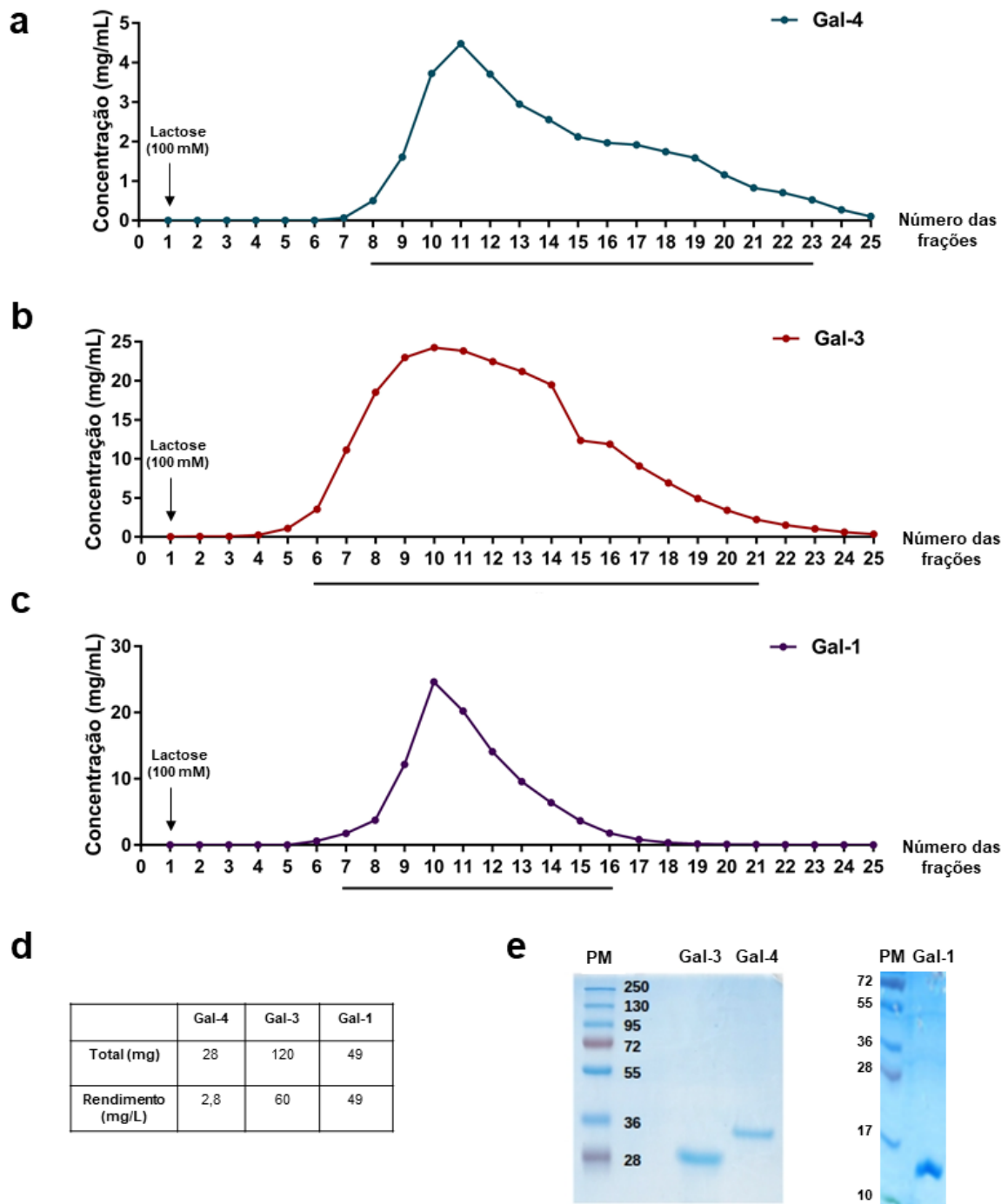
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Produção e caracterização das galectinas

As galectinas recombinantes humanas utilizadas neste trabalho foram produzidas por expressão heteróloga em sistema procarioto conforme descrito na seção 3.1. de *Materiais e Métodos*. Foram produzidos lotes únicos para Gal-4, Gal-3 e Gal-1 como forma de padronizar as condições das amostras utilizadas nos experimentos subsequentes. Para a produção dos lotes de galectinas purificadas partiu-se dos sobrenadantes de lisados equivalentes a 10 L de cultura de bactérias para Gal-4, 2 L para Gal-3 e 1 L para Gal-1. A purificação dessas lectinas recombinantes foi feita por cromatografia de afinidade em resinas de  $\alpha$ -lactose-agarose e os perfis cromatográficos foram monitorados através da determinação da concentração proteica de cada fração coletada (Figura 10a, 10b e 10c). Frações com valor superior a 0,500 mg/mL para Gal-4, 2,000 mg/mL para Gal-3 e 1,000 mg/mL para Gal-1 foram reunidas, divididas em alíquotas de mesma concentração e em seguida armazenadas em freezer -80 °C. A homogeneidade desses lotes foi aferida por SDS-PAGE.

Foram obtidas 14 frações de 1 mL de Gal-4 a 2,022 mg/mL, 37 frações de 1 mL de Gal-3 a 3,330 mg/mL e 25 frações a 1,901 mg/mL de Gal-1. No total, foram produzidos aproximadamente 28 mg de Gal-4, 120 mg de Gal-3 e 49 mg de Gal-1 com rendimentos de, respectivamente, 2,8 mg/L, 60 mg/L e 49 mg/L (Figura 10d). Na caracterização de alíquotas dos lotes por gel SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras detectamos bandas de proteínas únicas de aproximadamente 35 kDa para a Gal-4, 28 kDa para a Gal-3 e 15 kDa para a Gal-1 (Figura 10e). Esses dados indicam um elevado grau de homogeneidade das preparações de galectinas purificadas, estando os valores de massa aparente de acordo com dados da literatura (Stowell et al., 2015).

Ainda, o uso da metodologia por eluição em coluna de  $\alpha$ -lactose-agarose indica que as preparações purificadas possuem atividade lectínica preservada, sendo assim passíveis de serem utilizadas nos experimentos subsequentes em *E. coli* O86.

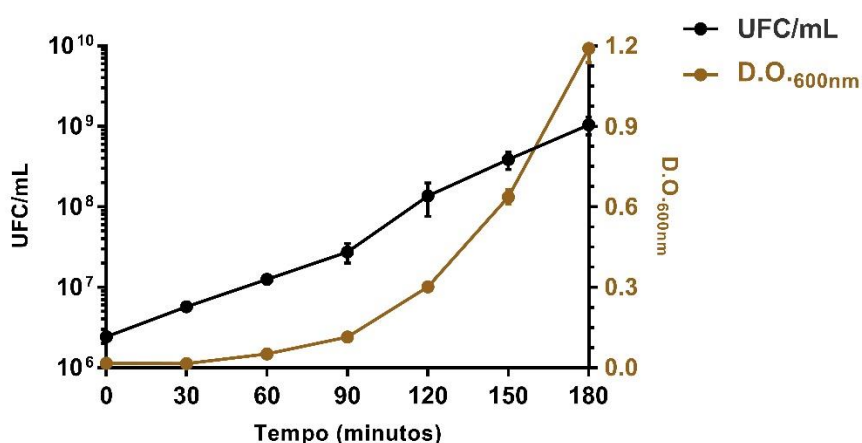


**Figura 10. Produção e verificação da homogeneidade dos lotes de Gal-4, Gal-3 e Gal-1 recombinantes.** Perfil de eluição das frações de (a) Gal-4, (b) Gal-3 e (c) Gal-1 com uso de solução de lactose (100 mM) em colunas de  $\alpha$ -lactose-agarose. O perfil de eluição foi monitorado pela medida de absorvância de 280 nm e as concentrações expressas no eixo y foram baseadas nos parâmetros de  $\epsilon$  e MM de cada proteína. A linha paralela ao eixo x indica as frações que foram reunidas, divididas em alíquotas de 1 mL e armazenadas em freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (d) Tabela com dados de rendimento total e (e) perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras dos lotes de Gal-4, Gal-3 e Gal-1 purificadas. PM – Marcadores de peso molecular.

## 4.2. Caracterização do crescimento de *E. coli* O86

Como forma de padronizarmos as concentrações iniciais de *E. coli* O86 utilizadas nos experimentos subsequentes, construímos uma curva de crescimento correlacionando a D.O.<sub>600nm</sub> com o equivalente em UFC/mL para o nosso modelo.

Observamos uma tendência linear crescente em base log<sub>10</sub> da concentração bacteriana no meio de cultivo, enquanto a curva de D.O.<sub>600nm</sub> assumiu uma tendência exponencial, com coeficiente angular assumindo valores mais altos após 90 minutos de incubação que caracteriza a fase de crescimento logarítmico da bactéria (Figura 11). A partir dessa curva, foi padronizada a D.O.<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0,300, em meio à fase log, como sendo o ponto de partida com equivalente a  $1,25 \times 10^8$  UFC/mL para a realização dos experimentos subsequentes para essa linhagem bacteriana. As concentrações iniciais utilizadas foram, portanto, diluições da concentração padronizada.



**Figura 11. Curva de crescimento de *E. coli* O86.** Inóculo de *E. coli* O86 teve seu crescimento monitorado a cada 30 minutos por UFC/mL e o correspondente em D.O.<sub>600nm</sub> por meio de leitura em espectrofotômetro. Curva com círculos preenchidos em cor preta refere-se à concentração bacteriana do inóculo (eixo y da esquerda) enquanto a curva com círculos preenchidos em cor marrom refere-se à leitura de D.O.<sub>600nm</sub> (eixo y da direita). Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.



### 4.3. Caracterização dos efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86

Com a finalidade de avançarmos na caracterização do efeito bactericida Gal-4 em *E. coli* O86, bem como a comparação dos efeitos provocados por esta lectina com a Gal-3, que se liga no O-PS da mesma bactéria, e com os mecanismos de AMPs, que são moléculas que se ligam no mesmo alvo molecular (o LPS) por meio de um sítio de ligação distinto (o lipídeo A), realizamos diferentes abordagens como forma de verificar: *i*) a cinética da interferência da Gal-4 sobre a viabilidade de *E. coli* O86; *ii*) investigação de concentrações de galectinas que reduzem a viabilidade da bactéria bem como o impacto destas na topografia de membrana através de análise de AFM; *iii*) investigação por DM da inserção de Gal-4C em um modelo de membrana de *E. coli* O86; *iv*) influência dos mecanismos de resistência a AMPs sobre os efeitos antibacterianos de galectinas e *v*) determinação da influência de agentes antioxidantes e quelantes que reduzem a morte provocada por antibióticos bactericidas por inibirem a reação de Fenton intracelular, nos efeitos de Gal-4.

#### 4.3.1. Caracterização cinética do impacto de Gal-4 sobre a viabilidade de *E. coli* O86

Foi relatado pelo artigo de Stowell e colaboradores (2010) que, após segundos de adição de Gal-4 em *E. coli* O86, já é possível se observar a perda de movimento do organismo em microscopia óptica. Como forma de avaliarmos se tal perda de movimento reflete na perda de viabilidade da população como um todo, fizemos a caracterização da cinética de morte de *E. coli* O86 incubando  $1 \times 10^7$  UFC/mL de bactérias com 5  $\mu$ M de Gal-4 ou PBS a 180 rpm e 37 °C e retirando as amostras após 1, 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos de incubação. Como controle, adicionamos grupos tratados com ampicilina (Amp), na concentração de 20  $\mu$ g/mL, e realizamos a contagem para estes grupos tratados após 20 e 120 minutos. As amostras retiradas do agitador orbital foram imediatamente colocadas em solução de lactose 20 mM e banho de gelo como forma de cessar a ação bactericida de Gal-4 antes do processo de diluição e plaqueamento.

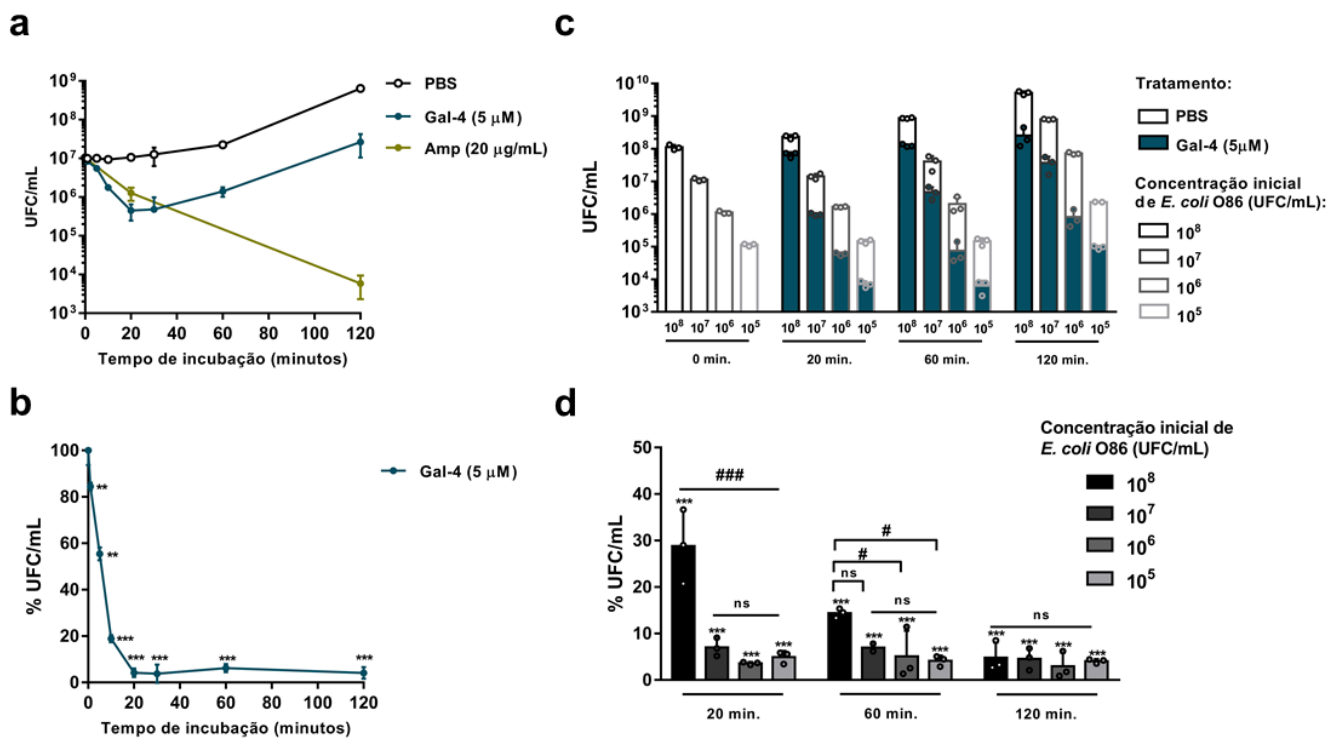
Nossos dados demonstraram que houve redução da viabilidade das bactérias para 83% já após 1 minuto de incubação com Gal-4. Em 5 minutos reduziu para 57% e, em 10 minutos, para aproximadamente 20%. De 20 a 120 minutos a porcentagem relativa permaneceu em aproximadamente 5% (Figura 12b). Quando analisamos a concentração absoluta de bactérias do mesmo experimento, houve uma queda de viabilidade nos primeiros 20 minutos de incubação, porém, após o 20º minuto, a curva das bactérias tratadas com Gal-4 (linha azul) cresceu desse ponto com tendência semelhante à curva controle tratada com PBS (linha preta),

diferentemente dos grupos tratados com Amp (linha amarela), nos quais a perda de viabilidade seguiu uma tendência contínua ao longo do período analisado neste experimento (Figura 12a). Notamos ainda que, apesar do crescimento absoluto, não houve crescimento relativo a partir do 20º minuto de incubação (Figura 12b).

Devido ao resultado anterior, nos perguntamos se o crescimento observado das bactérias, a partir do 20º minuto deve-se a uma possível redução da quantidade de Gal-4 disponível para promover a morte de unidades viáveis, uma vez que, como essa lectina promove a morte das bactérias via reconhecimento do LPS (Stowell et al. 2010), poderia ocorrer a ligação de Gal-4 nas células de bactérias já mortas. Haveria, portanto, uma redução na quantidade disponível destas lectinas para se ligarem no LPS de bactérias viáveis e, conseqüentemente, provocarem sua morte.

Sendo assim, avaliamos a dependência da concentração inicial de *E. coli* O86 no ensaio de viabilidade através de um experimento no qual fixamos a concentração de Gal-4 utilizada para a incubação (5 µM), mas variamos as concentrações iniciais de bactéria ( $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^5$  UFC/mL) e em três tempos: 20, 60 e 120 minutos.

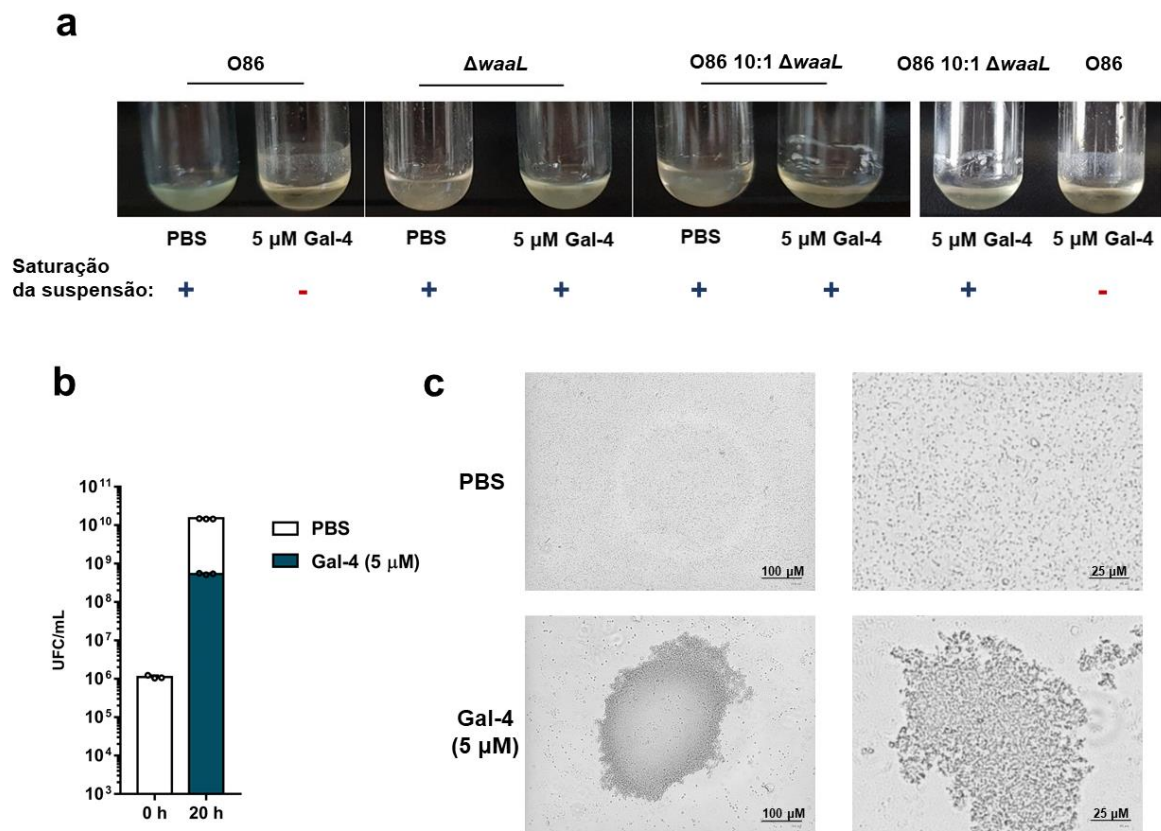
Os dados mostraram um perfil semelhante aos resultados anteriores, ilustrados na figura 12c e 12d, para as concentrações iniciais de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  UFC/mL quando tratadas com Gal-4: houve uma redução de unidades viáveis aos 20 minutos de tratamento tanto na contagem absoluta (Figura 12c) quanto na relativa (Figura 12d), seguido de um aumento absoluto e uma estabilização relativa em 60 e 120 minutos. Entretanto, para o grupo com concentração inicial de  $1 \times 10^8$  UFC/mL a viabilidade dos grupos tratados eram de aproximadamente 30% aos 20 minutos, 12% aos 60 minutos e 5% em 120 minutos de incubação, indicando que, para essa maior concentração inicial testada de bactérias, a cinética de redução de viabilidade é mais lenta do que para as outras concentrações, que apresentaram o mesmo perfil de decaimento e crescimento posterior de unidades viáveis após o tratamento com Gal-4.



**Figura 12.** A atividade bactericida da Gal-4 apresenta uma cinética distinta de ampicilina e dependente da concentração inicial de *E. coli* O86. (a, b) Suspensões de *E. coli* O86 ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) foram incubadas com PBS (controle), 5  $\mu$ M de Gal-4 ou 20  $\mu$ g/mL de Amp em diferentes tempos (0, 1, 5, 10, 20, 30, 60 ou 120 minutos) a 180 rpm e 37 °C. Para cada tempo de incubação as UFC foram contadas como forma de estimar a concentração de unidades viáveis. (a) Concentração absoluta de bactérias dos grupos tratados com PBS (linha preta), com 5  $\mu$ M de Gal-4 (linha azul) e 20  $\mu$ g/mL de Amp (linha amarela). (b) Porcentagem de viabilidade de amostras tratadas com Gal-4 em relação aos controles tratados com PBS de cada tempo. (c, d) Diferentes concentrações iniciais de *E. coli* O86 selvagem ( $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^5$  UFC/mL) foram incubadas com PBS ou 5  $\mu$ M de Gal-4 em diferentes tempos (20, 60 e 120 minutos) a 180 rpm e 37 °C. A viabilidade das culturas de bactérias foram determinadas pela contagem de UFC. (c) Contagem absoluta de UFC/mL para cada tempo. Barras azuis indicam as contagens dos grupos tratados com Gal-4 em relação aos respectivos controles (barras brancas). (d) Contagens relativas aos grupos tratados com PBS das amostras tratadas com Gal-4 para cada tempo. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes, para três replicatas de cada amostra. \*\* $p < 0,01$ ; e \*\*\* $p < 0,0001$  em relação aos controles com PBS e # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,0001$ ; e ns= não significativo, quando indicado.

Devido aos resultados anteriores, nos questionamos qual seria a concentração de bactérias viáveis após incubação de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *E. coli* O86 por 20 horas com 5  $\mu$ M de Gal-4, bem como eventuais características macro e microscópicas dessas suspensões. Após 20 horas de incubação as suspensões de *E. coli* O86 tratadas com PBS ficaram saturadas, enquanto os grupos tratados com Gal-4 ficaram límpidos, com presença de grumos macroscópicos ao fundo (Figura 13a, à esquerda). Ainda, ao realizarmos incubação de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *E. coli* O86  $\Delta waaL$ , que não possui a unidade repetida O do LPS que é alvo da Gal-4, ou de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *E. coli* O86 junto a  $1 \times 10^5$  UFC/mL de *E. coli* O86  $\Delta waaL$  a aparência das suspensões foi saturada para ambos os grupos tratados com PBS ou 5  $\mu$ M de Gal-4 (Figura 13a – ao centro e à direita). Investigando-se a quantidade de unidades viáveis destes grupos através

de contagem por UFC, verificamos que os grupos tratados com PBS apresentaram uma quantidade de unidades viáveis de aproximadamente  $1,5 \times 10^{10}$  UFC/mL, ao passo que as *E. coli* O86 tratadas com Gal-4 apresentaram um número aproximado de  $5 \times 10^8$  UFC/mL, valor que representa 3,5% da quantidade de unidades viáveis presentes no grupo controle (Figura 13b). Além disso, na análise microscópica em campo claro dos grupos tratados com PBS as bactérias se encontraram monodispersas enquanto quando tratadas com Gal-4 é possível observar as bactérias aglutinadas em grumos de diâmetros variados, desde dezenas até centenas de micrômetros (Figura 13c).



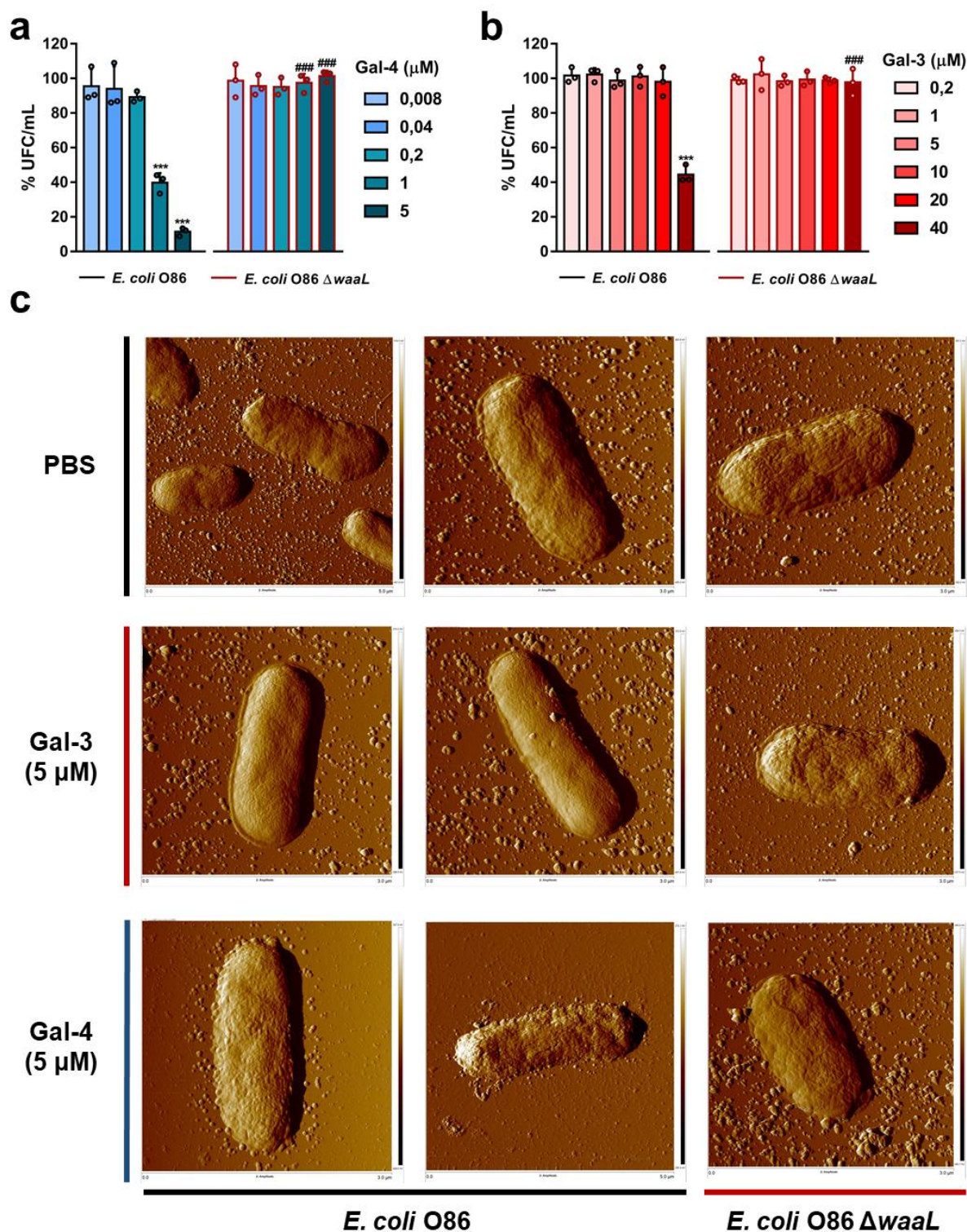
**Figura 13. Incubação de *E. coli* O86 por 20 horas com Gal-4 provoca a presença de bactérias viáveis acumuladas em extensos aglutinados celulares.**  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *E. coli* O86 foram incubadas com PBS ou Gal-4 (5 μM) por 20 horas a 180 rpm e 37 °C. (a) Foto de tubos contendo *E. coli* O86 selvagem,  $\Delta waaL$ , ou em suspensão mista na proporção O86 10 : 1  $\Delta waaL$ , após 20 horas de tratamento com PBS ou Gal-4 (5 μM). Foi reportado como positivo quando observada a saturação da suspensão, e negativo quando não observada. (b) Contagem absoluta de unidades viáveis das amostras após 20 horas de tratamento com PBS e Gal-4. Barras brancas, grupos tratados com PBS; barras azuis, grupos tratados com Gal-4 (5 μM). Dados representativos de três experimentos independentes para três replicatas de cada amostra. (c) Microscopia em campo claro de amostras tratadas com PBS ou Gal-4.

Sendo assim, nossos dados indicaram que Gal-4 provocou uma rápida perda de viabilidade com cinética dependente da concentração inicial de *E. coli* O86 presente no meio. Esse fenômeno foi distinto do provocado pelo efeito bactericida de Amp, já que após o decaimento inicial de viabilidade ocorreu o crescimento absoluto de uma fração da população de bactérias independentemente da razão de *E. coli* O86 e Gal-4 presentes inicialmente, sugerindo que se trata de uma porcentagem de células dentro da mesma população resistente à ação da Gal-4. Entretanto, vale notar que a porcentagem de unidades viáveis após tratamento com 5  $\mu$ M de Gal-4 foi inferior aos grupos tratados com PBS, mesmo para 20 horas de tratamento. Ainda, neste tempo de tratamento unidades viáveis de *E. coli* O86 ficaram retidas em extensos grumos celulares.

#### 4.3.2. Curvas de concentração de Gal-4 e Gal-3 e a influência dos efeitos dessas lectinas na topografia de membrana de *E. coli* O86 selvagem e $\Delta waaL$

Baseando-se nos resultados anteriores, padronizamos o tempo de incubação de 20 minutos e a concentração bacteriana inicial de  $1 \times 10^7$  UFC/mL para todos os experimentos de determinação de viabilidade subsequentes, como forma de averiguar os efeitos agudos da incubação por galectinas em *E. coli* O86. Ainda, resolvemos investigar a dependência da ligação lectínica na ação bactericida da Gal-4, tanto a nível de redução de viabilidade como por alterações na topografia da membrana. Sendo assim, inicialmente realizamos uma curva com concentrações de Gal-4 (0,008; 0,04; 0,2; 1 e 5  $\mu$ M) e Gal-3 (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40  $\mu$ M) na concentração de  $1 \times 10^7$  de *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$  por 20 minutos, como forma de avaliarmos as concentrações mínimas capazes de reduzir a viabilidade dessas bactérias. Em *E. coli* O86 as concentrações de 5 e 1  $\mu$ M de Gal-4 reduziram as viabilidades para, respectivamente, 10% e 40% dos controles tratados com PBS. As demais concentrações de Gal-4 não reduziram significativamente a viabilidade de *E. coli* O86, e para a *E. coli* O86  $\Delta waaL$ , que não possui o alvo O-PS da Gal-4, nenhuma das concentrações testadas dessa lectina foi capaz de reduzir a viabilidade bacteriana. Surpreendentemente, 40  $\mu$ M de Gal-3 reduziu a viabilidade de *E. coli* O86 para aproximadamente 50%. Apesar de tratar-se de uma alta concentração desta lectina, é um efeito dependente da presença do O-PS, já que tal redução de viabilidade não foi observada em *E. coli* O86  $\Delta waaL$ , assim como para nenhuma das demais concentrações desta lectina testadas em ambas as bactérias selvagem e mutante.

Além disso, visamos compreender o mecanismo bactericida de Gal-4 e o seu impacto direto na membrana de *E. coli* O86. Desta forma, realizamos ensaio de microscopia de força atômica (AFM - do inglês “Atomic Force Microscopy”) em amostras de *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$  tratadas por 2 horas com PBS, Gal-3 (5  $\mu$ M) e Gal-4 (5  $\mu$ M). Observamos que na amostra de *E. coli* O86 tratada com Gal-4 houve perda de integridade de membrana bacteriana e formação de vesículas extracelulares (Figura 14c – terceira linha à esquerda e ao centro), enquanto não foi observada alteração em relação ao controle de tratamento com PBS de amostras de *E. coli* O86 tratadas com Gal-3 (Figura 14c – segunda linha à esquerda e ao centro) e de *E. coli* O86  $\Delta waaL$  tratadas com Gal-3 ou Gal-4 (Figura 14c - coluna à direita).



**Figura 14.** O efeito antibacteriano de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86 é dependente da presença do O-PS e a Gal-4 provoca perda de integridade de membrana e formação de extrusões vesiculares. Contagem de UFC após tratamento de *E. coli* O86 selvagem e ΔwaaL ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) por 20 minutos com diferentes concentrações de (a) Gal-4 (0,008 a 5 μM) e (b) Gal-3 (0,2 a 40 μM). Dados expressam a média ± desvio padrão da porcentagem em relação aos controles tratados com PBS de três experimentos independentes, para três replicatas de cada amostra. \*\*\*  $p < 0,0001$  em relação aos controles tratados com PBS e ###  $p < 0,0001$  em relação ao mesmo tratamento na bactéria selvagem. (c) Análise por microscopia de força atômica de *E. coli* O86 selvagem e ΔwaaL ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) após 2 horas de tratamento com PBS, Gal-4 (5 μM) ou Gal-3 (5 μM).

Tais resultados indicaram que os efeitos de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86 são dependentes da interação via CRD destas lectinas no alvo O-PS da bactéria. Ainda, o efeito bactericida de Gal-4 promove perda de integridade de membrana e Gal-3 reduziu de forma carboidrato-dependente a viabilidade de *E. coli* O86 selvagem. Desta forma, foram selecionadas as concentrações de 0,2 e 1  $\mu\text{M}$  de Gal-4 como sendo, respectivamente, a máxima concentração não-bactericida e a mínima concentração bactericida de Gal-4 para serem adicionadas concomitantemente a outras moléculas nos experimentos seguintes. Essas concentrações foram escolhidas por apresentarem uma faixa de atividade discriminável para efeitos sinérgicos e/ou antagônicos de perda de viabilidade, já que a atividade bactericida de 1  $\mu\text{M}$  é média (aproximadamente 60%), podendo ser regulada tanto positiva quanto negativamente, enquanto 0,2  $\mu\text{M}$  é ideal para verificação de efeitos sinérgicos com concentrações letais ou subletais de outros agentes antimicrobianos. Ainda, optamos por adotar 40  $\mu\text{M}$  como uma referência do efeito antibacteriano de Gal-3, por se tratar de um efeito dependente da presença do O-PS de *E. coli* O86 e reduzir a viabilidade desta bactéria para aproximadamente 50%. Além disso, as demais concentrações de Gal-3 (0,2 a 20  $\mu\text{M}$ ) foram adotadas como concentrações subletais desta lectina para experimentos subsequentes de associação com outros agentes antimicrobianos. Tendo verificado que a adição de Gal-4 resulta em perda de integridade de membrana de *E. coli* O86, nas próximas etapas deste trabalho investigamos a ação desta lectina a nível de membrana, bem como a influência de mecanismos de proteção de membrana bacteriana na promoção destes efeitos.



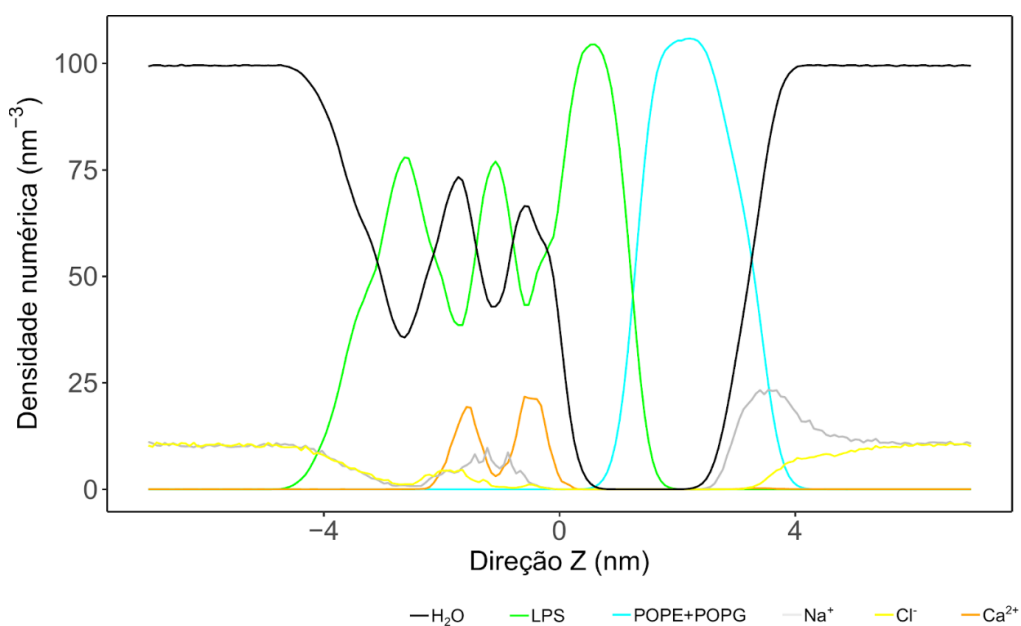
### 4.3.3. Investigação por DM da interação e inserção de Gal-4C em um modelo de membrana de *E. coli* O86

Como forma de avançarmos na caracterização do dano de membrana induzido por Gal-4, investigamos a inserção de Gal-4C em um modelo de membrana de *E. coli* O86 por dinâmica molecular (DM). Optamos por investigar o domínio C-terminal da Gal-4C, devido a esta unidade ser suficiente para promoção de morte em *E. coli* O86 (Stowell et al. 2010), e ter estrutura cristalizada e depositada no PDB (Rustiguel et al. 2016). Ainda, a dinâmica para a estrutura inteira de Gal-4 não é computacionalmente viável devido à grande flexibilidade imposta pelo peptídeo ligador e ausência de estrutura cristalográfica.

Sendo assim, montamos o sistema conforme descrito na seção 3.12.1 de *Materiais e Métodos*. A partir desse modelo realizamos: *i*) dinâmica da membrana pura (sem Gal-4C) como forma de verificar a estabilidade e validação dos componentes do sistema; *ii*) reconstrução da estrutura e determinação das propriedades estruturais de Gal-4C (PDB: 5CBL); *iii*) dinâmica da interação de Gal-4C com a superfície de membrana por simulação convencional e *iv*) dinâmica da inserção de Gal-4C com a superfície de membrana por SMD. Ainda, realizamos a comparação da superfície hidrofóbica e potencial eletrostático entre Gal-4C e o domínio N-terminal de Gal-4 (Gal-4N)

#### 4.3.3.1. Dinâmica da membrana pura

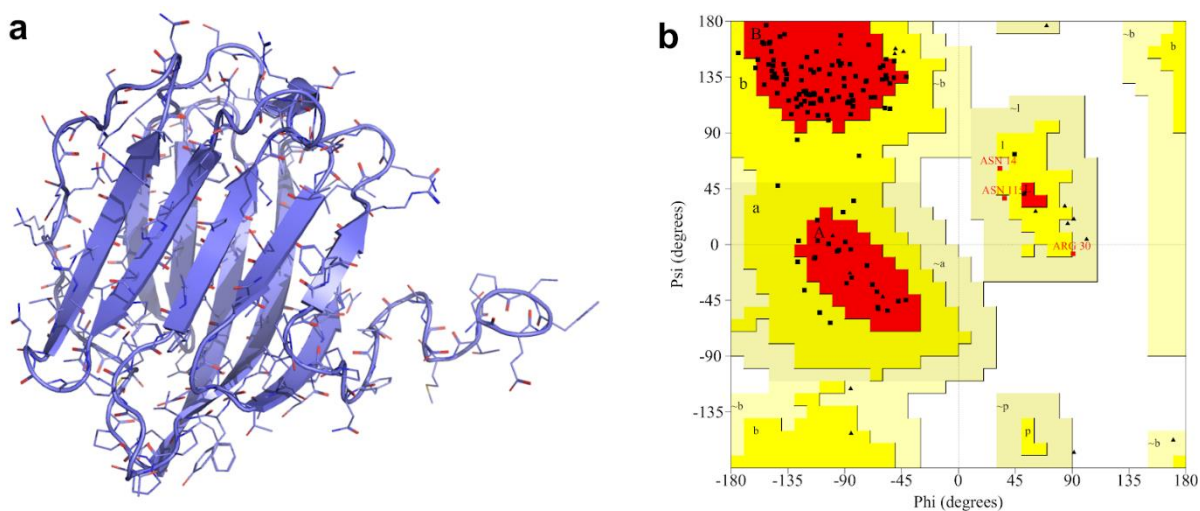
A simulação por DM do sistema contendo o modelo de membrana externa da *E. coli* O86 com uma unidade do grupo O86 foi conduzida por 100 ns. A manutenção da integridade do modelo foi avaliada inicialmente a partir das distribuições de densidades dos átomos ao longo do eixo z dividindo o sistema em 200 fatias (Figura 15). Observa-se densidade nula das moléculas de água no espaço hidrofóbico formado pela junção das caudas das moléculas de LPS em uma face e POPE + POPG da outra face, o que revela a adequação do modelo às condições esperadas de solvatação.



**Figura 15. Distribuição das entidades moleculares que formam o modelo de membrana externa da *E. coli* O86 ao longo da simulação por DM.** A densidade numérica dos átomos foi calculada para cada tipo de molécula presente no sistema: H<sub>2</sub>O (preto), face externa de LPS (verde), face interna POPE + POPG (ciano), íons Na<sup>+</sup> (cinza), íons Cl<sup>-</sup> (amarelo) e íons Ca<sup>2+</sup> (laranja).

#### 4.3.3.2. Reconstrução da estrutura de Gal-4C e suas propriedades estruturais

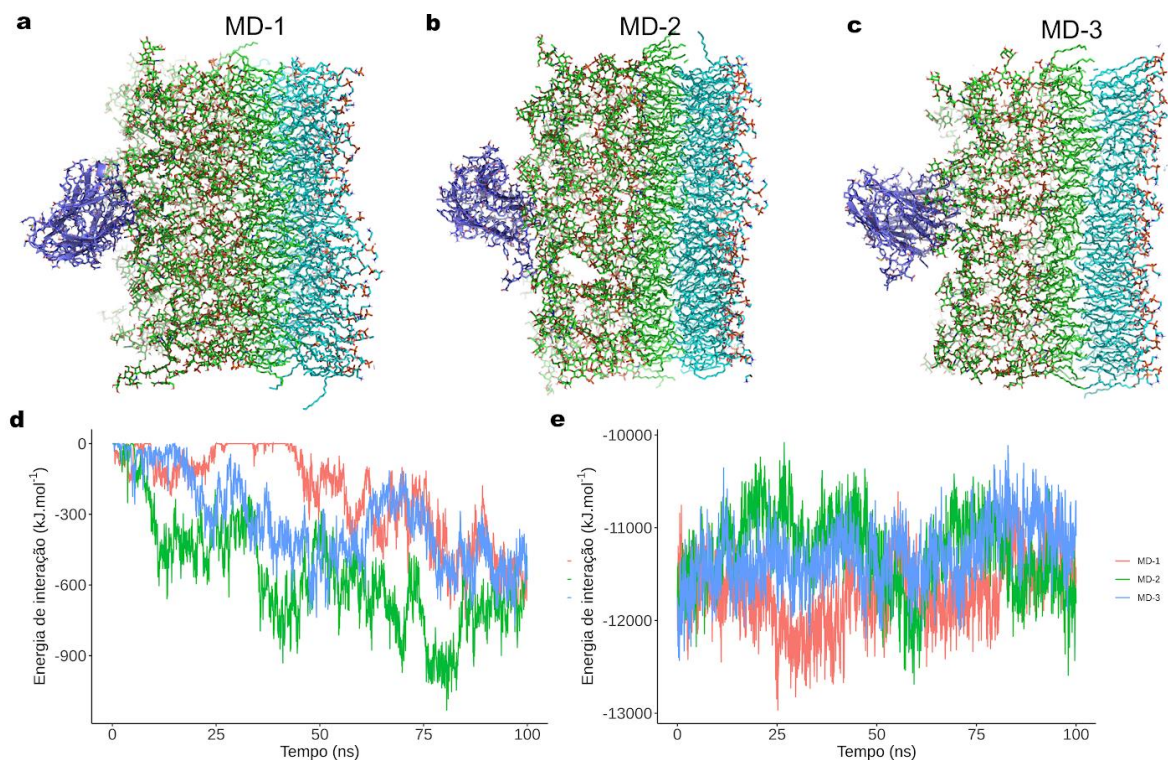
A estrutura tridimensional da Gal-4C reconstruída com o programa Modeller gerou um modelo (Figura 16a) com escore DOPE (do inglês “Discrete Optimized Protein Energy”) igual a -15698, o que assegura a boa construção do modelo (Shen e Sali 2006). Adicionalmente, os dois ângulos de torção  $\phi$  e  $\psi$ , que determinam a conformação da cadeia principal da proteína, encontram-se concentrados 100% em regiões permitidas ou favoráveis do gráfico de Ramachandran, sendo 85,6% dos resíduos em regiões mais favoráveis (regiões A, B e L), 11,9% em permitidas (regiões a, b, l e p) e 2,5% em generosamente permitidas (regiões ~a, ~b, ~l e ~p - Figura 16b).



**Figura 16. Modelagem de Gal-4C.** O domínio C-terminal da Gal-4 foi modelado para incluir resíduos ausentes ou incompletos na estrutura cristalográfica para ser utilizado nas simulações. (a) Estrutura gerada e (b) gráfico de Ramachandran dos resíduos de Gal-4C.

#### **4.3.3.3. Dinâmica da interação da Gal-4C com a superfície da membrana (simulação convencional)**

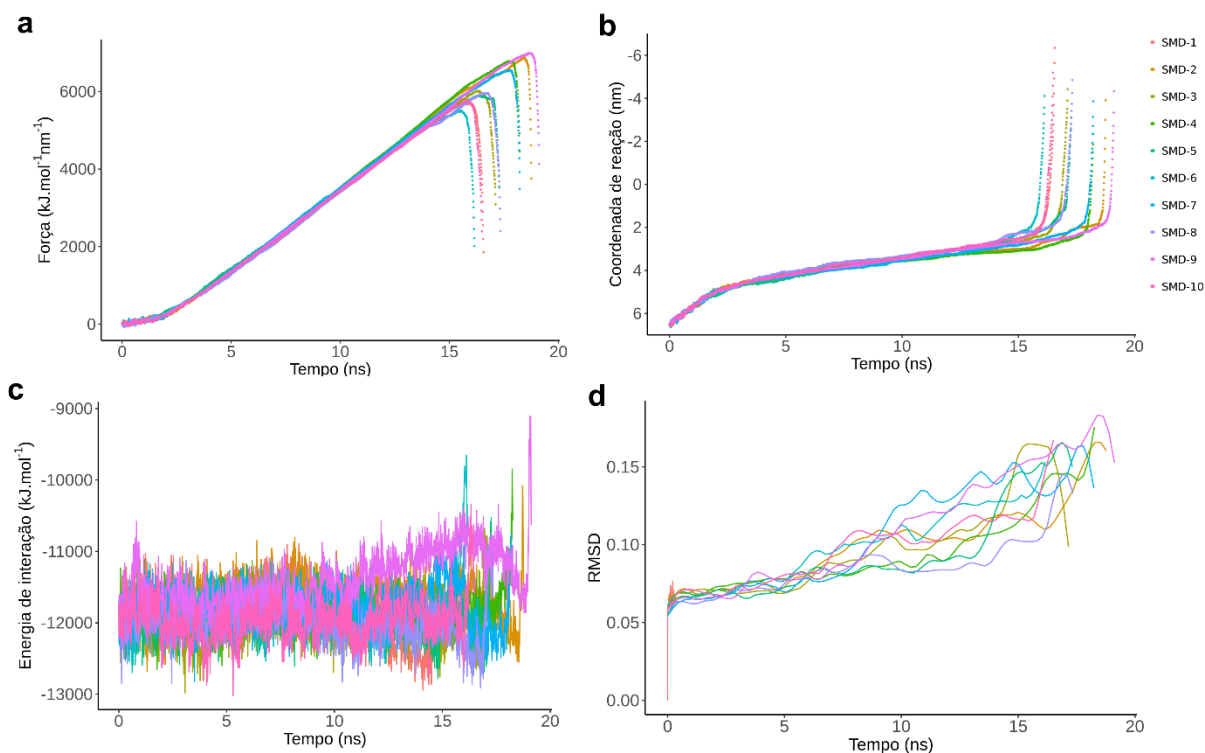
Como forma de avaliarmos primeiramente uma possível interação/inserção da Gal-4C no modelo construído de membrana de *E. coli* O86, realizamos uma dinâmica molecular (DM) desta lectina neste modelo. Foram realizadas 3 simulações de 100 ns, nas quais observamos a aproximação da Gal-4C com a porção O-PS do LPS de *E. coli* O86. Ainda, verificamos diferentes disposições finais (Figura 17a - c) e caminhos de energia potencial nestas 3 simulações (Figura 17d). Analisando as trajetórias e disposições do domínio ao longo da simulação, verificamos que, no caminho de menor energia de interação (MD-2), a Gal-4C interagiu primeiramente por uma região próxima ao CRD (tempos de 30 a 50 ns) para então interagir com o CRD (tempo de 75 a 80 ns), que corresponde à menor energia alcançada. Ainda, a simulação MD-3 mostra que interações com regiões próximas a estas, citadas anteriormente, também favorecem um caminho de menor energia de interação, enquanto a simulação MD-1, que não experimentou interações com esta região, apresentaram maiores energias de interação (Figura 17a, 17c e 17d). Analisando a energia de interação com todos os átomos do sistema, verificamos uma estabilidade nas três simulações realizadas (Figura 17e). Entretanto, não observamos inserção de Gal-4C na porção lipídica da membrana nas simulações realizadas, devido a uma alta barreira de energia potencial que não é vencida pela dinâmica convencional e curto espaço de tempo de simulação. Sendo assim, nos próximos passos empregamos simulações SMD como forma de caracterizar o comportamento de Gal-4C durante a inserção na membrana modelo de *E. coli* O86.



**Figura 17. Gal-4C interage com o O-PS de *E. coli* O86 com energias de interação mais favoráveis através de seu CRD.** Investigação por DM convencional da aproximação da Gal-4C sobre a superfície da camada de LPS do modelo de membrana da *E. coli* O86. A configuração final em 100 ns para cada uma das triplicatas (a) MD-1, (b) MD-2 e (c) MD-3 mostra diferentes orientações da Gal-4C em relação à membrana. As energias de interação entre a Gal-4C em (d) membrana e (e) solvente indicam diferentes amostragens ao longo das simulações, mas com energias em 100 ns muito próximas.

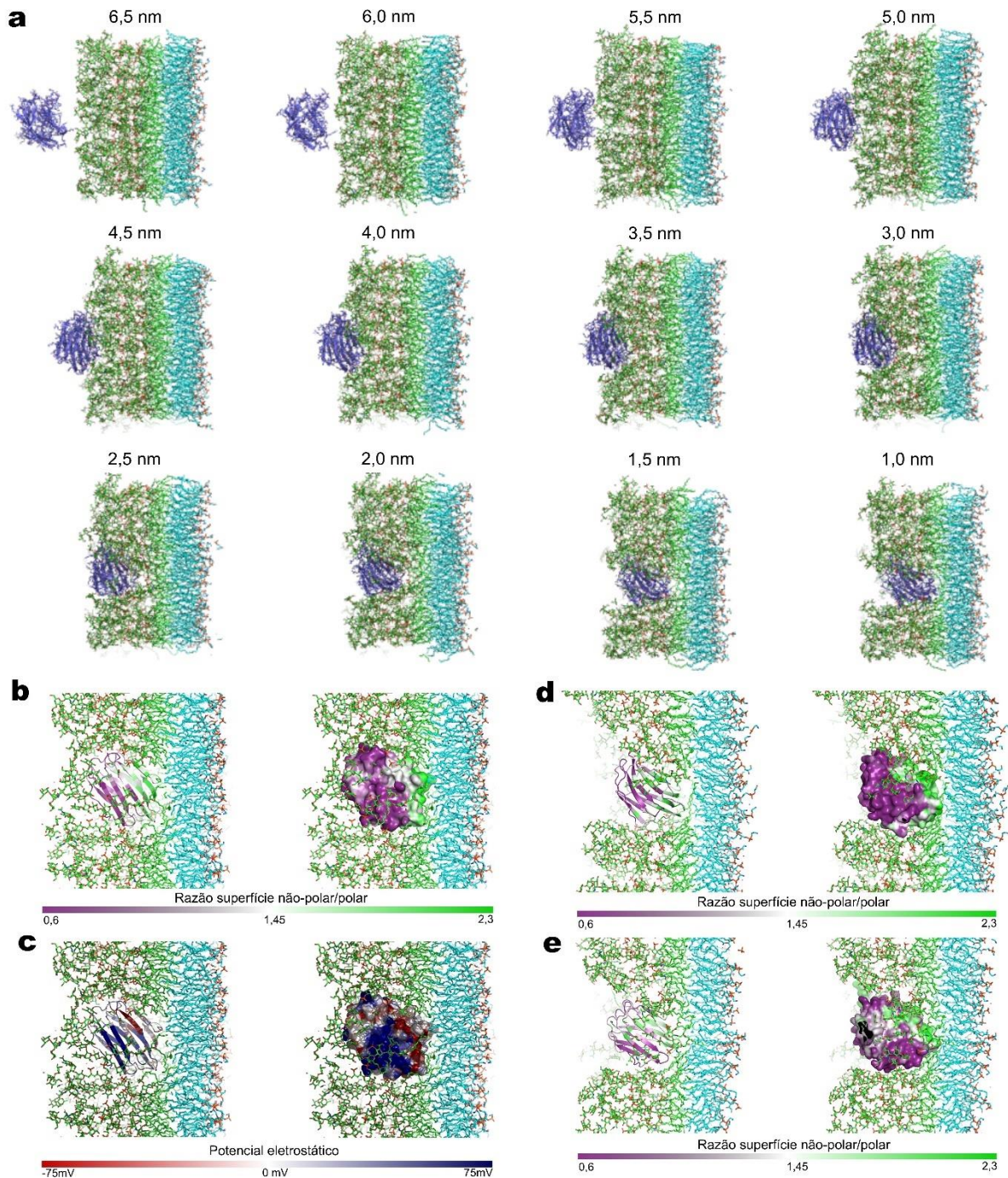
#### 4.3.3.4. Dinâmica da inserção de Gal-4C com a superfície da membrana por SMD

Nesta etapa, realizamos simulações por SMD como forma de avaliar o comportamento da Gal-4C em uma situação de inserção na membrana de *E. coli* O86. Nestas simulações, a Gal-4C é puxada pela ação de uma força externa dependente do tempo em direção à membrana e paralela ao eixo z de forma a induzir a entrada desta no sistema. As 10 simulações SMD, realizadas com distribuições de velocidades iniciais distintas, resultaram em diferentes trajetórias de aproximação e inserção na membrana. A força máxima resultante do potencial harmônico aplicado para puxar a Gal-4C em direção à membrana ao longo do tempo apresentou valores entre 5513 (SMD-6) e 6995 (SMD-9)  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{nm}^{-1}$  (Figura 18a). As distâncias no eixo z entre os centros de massa da Gal-4C e da membrana (coordenada de reação) apresentaram inicialmente valores em torno de 6,6 nm, devido à disposição inicial da Gal-4C no solvente, que foi naturalmente diminuindo conforme a proteína foi puxada até atingir valores críticos, ao redor de 2 nm, que depois foram subitamente diminuídos devido às menores barreiras potenciais para atravessar a membrana (Figura 18b). Ao longo da coordenada de reação, a Gal-4C experimentou interações com as outras entidades moleculares do sistema (membrana + água + íons) com energias de interação variando entre -13018 (SMD-10) até -12361 (SMD-9)  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Figura 18c). Interessantemente, a energia menos atrativa foi observada para a trajetória (SMD-9) que apresentou a maior resistência para inserção da Gal4C na membrana. Por outro lado, a trajetória com energia mais atrativa no processo de inserção na membrana (MD-1), com energia de interação igual a -12942  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  em 14,1 ns, foi a segunda a apresentar a menor resistência para inserção na membrana com a força máxima igual a 5711  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$ . A estrutura da Gal-4C não sofreu grandes mudanças estruturais devido à aplicação das restrições de distâncias impostas ao longo do processo de inserção para manutenção estrutural. As mudanças estruturais foram determinadas a partir do cálculo do RMSD (do inglês ‘*root-mean-square deviation*’) das coordenadas dos átomos  $C_{\alpha}$  dos resíduos 11-148 em relação à estrutura inicial (Figura 18d). Observa-se pequenas variações no RMSD, que se encontram próximos ou abaixo de 0.1 nm, mostrando que no processo de aproximação e inserção não ocorreram drásticas mudanças estruturais. Somente após o grande deslocamento devido ao rompimento das interações com a membrana foram observadas maiores variações no RMSD acima de 0.15 nm, mas que não indicam também grandes mudanças estruturais.



**Figura 18. Padronização do modelo de simulação por SMD da aproximação e inserção de Gal-4C na membrana de *E. coli* O86.** Dados são referentes a dez simulações (SMD-1 a SMD-10) com distribuição iniciais diferentes de velocidades. (a) Perfis de força, (b) tempo de inserção e transposição da membrana, (c) energia de interação da proteína com elementos do sistema-(membrana+água+íons) e (d) mudanças estruturais na cadeia principal da Gal-4C ao longo do tempo de simulação.

Combinando os resultados anteriores, podemos inferir que a trajetória com menor energia e que apresenta uma das menores forças aplicadas é um caminho mais provável num potencial processo de inserção da Gal-4C na membrana. Com base nestas considerações utilizamos a trajetória SMD-1, que apresentou a menor energia de interação ao longo do processo de inserção na membrana, para extração das coordenadas ao longo da coordenada de reação, para visualizar o processo de inserção da Gal-4C no modelo de membrana da *E. coli* O86 (Figura 19a). Nesta simulação foi observada uma orientação de inserção da Gal-4C na membrana onde uma região hidrofóbica da Gal-4C encontra-se voltada para a região hidrofóbica da membrana ao mesmo tempo em que podemos observar uma região com alto potencial eletrostático positivo envolto pelos carboidratos e grupos fosfato (Figura 19b e 19c). Esta orientação é coerente com um caminho guiado pelo favorecimento das energias e termodinâmica de inserção decorrente da anfifilicidade da Gal-4C. Curiosamente, esta mesma orientação, que pode ser guiada pela região hidrofóbica da Gal-4C inserindo-se na região hidrofóbica da membrana, foi também observada nas outras duas simulações SMD (SMD-6 e SMD-10), que apresentaram a menor força máxima (Figura 19d e 19e).

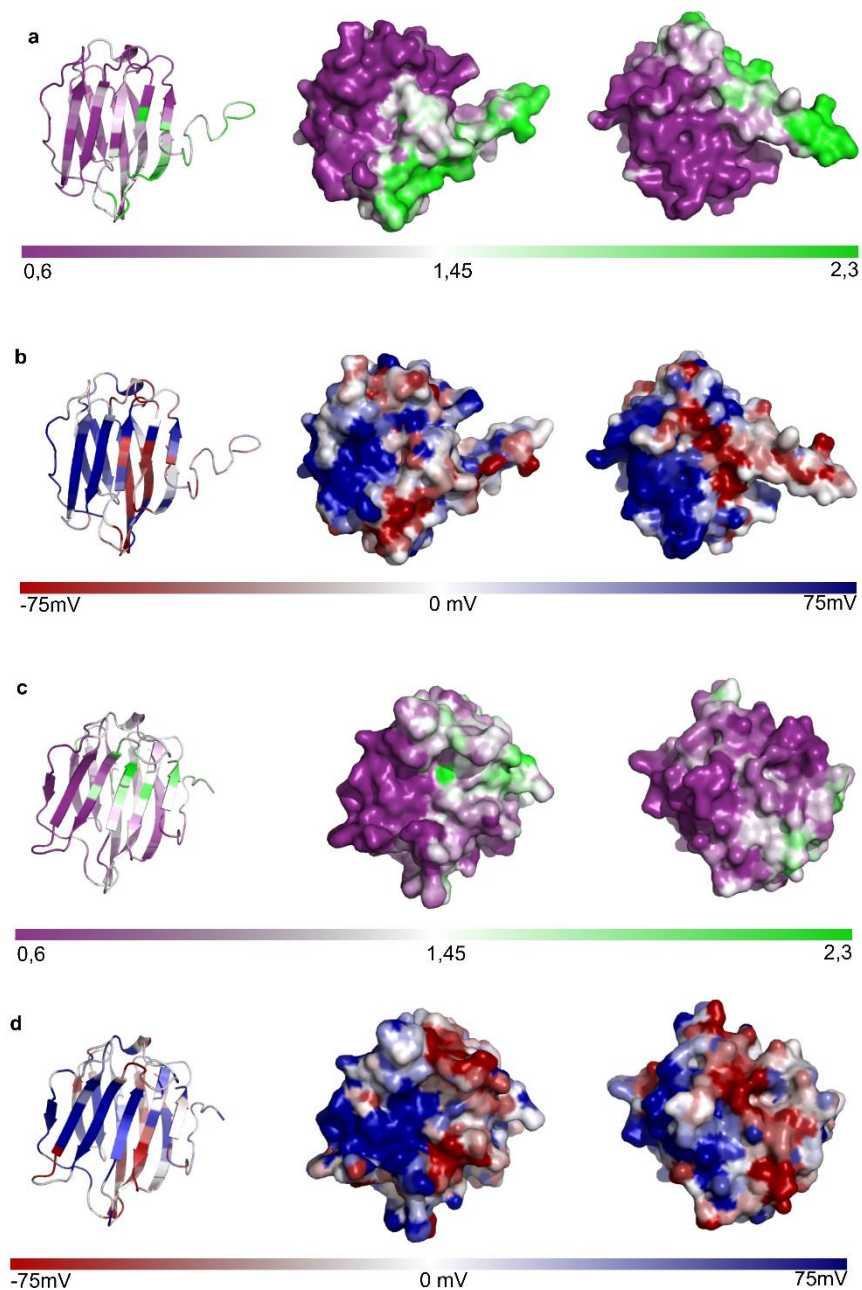


**Figura 19. A inserção de Gal-4C por simulações SMD foi mais favorável quando sua região hidrofóbica se orienta em direção à membrana de *E. coli* O86. (a)** Representação das configurações da trajetória obtida a partir da simulação SMD do sistema SMD-1 ao longo da coordenada de reação. O processo de aproximação e inserção da Gal-4C na membrana ao longo da coordenada de reação de 6,5 até 1,0 nm com intervalos de 0,5 nm é ilustrado. **b-e.** Configuração da Gal-4C por meio da simulação SMD na coordenada de reação de 1,0 nm. Estão representadas as estruturas secundárias (esquerda) e superfície acessível ao solvente (direita) na mesma visão. **(b)** Razão entre superfície não polar/polar (0,6 a 2,3) e **(c)** potencial eletrostático ( $\pm 75$  mV) de SMD-1. Razão entre superfície não polar/polar (0,6 a 2,3) de **(d)** SMD-6 e **(e)** SMD-10.



#### **4.3.3.5. Comparação da superfície hidrofóbica e potencial eletrostático sobre a superfície entre os domínios Gal-4C e Gal-4N**

Ainda, como forma de aprofundar na caracterização dos efeitos de Gal-4 em *E. coli* O86, reanalisamos os dados de superfície hidrofobia e potencial eletrostático sobre a superfície referentes às estruturas cristalográficas dos domínios de Gal-4 (Rustiguel et al. 2016): Gal-4C (PDB: 5CBL) e Gal-4N (PDB: 4XZP). Observamos que Gal-4N não apresenta uma região hidrofóbica, diferentemente de Gal-4C. Ainda, a Gal-4C apresenta uma elevada concentração de carga positiva na superfície oposta ao CRD, enquanto em Gal-4N a distribuição de carga é mais homogênea (Figura 20). Considerando que o domínio C-terminal da Gal-4 é responsável pelo efeito bactericida desta lectina em *E. coli* O86 por meio do reconhecimento do O-PS presente no LPS (Stowell et al. 2010), e que os mecanismos conhecidos de AMPs por interação em LPS dependem da natureza anfifílica dessas moléculas, com presença de carga positiva para interação com os grupos fosfato do lipídeo A e uma região hidrofóbica que se insere na membrana (Z. Yu et al. 2015; Bechinger e Gorr 2017), levantamos a hipótese de que a ação bactericida de Gal-4 dependeria de mecanismos de resistência a AMPs em *E. coli* O86.



**Figura 20.** Os domínios C- e N- terminais da Gal-4 apresentam perfis distintos de hidrofobicidade e potencial eletrostático. A razão entre a superfície não polar/polar e o potencial eletrostático sobre a superfície molecular foram calculados para **(a, b)** Gal-4C e para **(c, d)** Gal-4N. Estão representadas as estruturas secundárias (esquerda) e as superfícies acessíveis ao solvente (centro e direita), sendo que à direita é mostrada a visualização após rotação vertical de 180° da estrutura.

#### 4.3.4. Influência dos mecanismos de resistência a AMPs na ação antibacteriana de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86

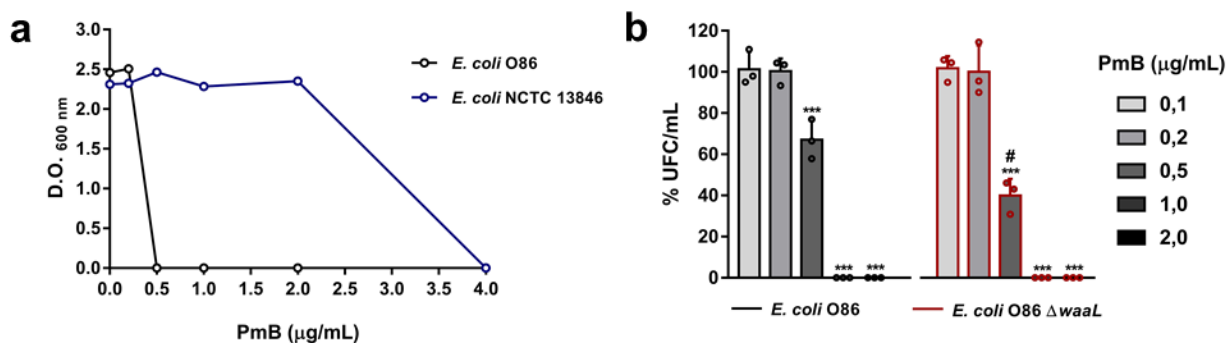
Nossos resultados anteriores demonstraram que os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86 dependem da interação com a porção O-PS do LPS. Ainda, a Gal-4C apresenta um potencial anfifílico por apresentar tanto uma região hidrofóbica como uma carga parcial positiva, e nossos resultados por SMD sugerem que a inserção desta lectina na membrana desta bactéria é favorecida quando a interação ocorre por meio de sua região hidrofóbica. Notavelmente, o LPS também é alvo de AMPs, moléculas com propriedades anfifílicas cuja interação de seus grupos positivos com os fosfatos presentes no lipídeo A, assim como de seus grupos hidrofóbicos com as cadeias lipídicas do LPS provoca morte por formação de poros na membrana externa bacteriana (Z. Yu et al. 2015).

No entanto, bactérias gram-negativas desenvolveram inúmeros mecanismos de resistência que evitam a interação desses agentes com o LPS (Simpson e Trent 2019; Liu et al. 2016). Dessa forma, resolvemos investigar se os efeitos observados de galectinas, a partir da interação com o LPS, dependeriam desse mecanismo. Para tanto, realizamos três abordagens para resolver esta questão: *i*) inibição da interação no LPS por adição de  $Mg^{2+}$  durante a incubação (C. C. Chen e Feingold 1972); *ii*) ativação e desativação dos sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B por meio de crescimento do inóculo bacteriano com altas concentrações de  $Mg^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  (García Vescovi, Soncini, e Groisman 1996; Wösten et al. 2000) e *iii*) verificação da influência do gene *mcr-1* na ação de Gal-4 e Gal-3 (Liu et al. 2016). Em nossos experimentos, optamos por realizar controles com polimixina-B (PmB), que apresenta o mesmo mecanismo de ação que AMPs e é inibido pelos mecanismos de resistência investigados (Z. Yu et al. 2015). Além disso, definidas as concentrações que reduzem a viabilidade bacteriana de Gal-4 (1 e 5  $\mu$ M) e Gal-3 (40  $\mu$ M) em *E. coli* O86, resolvemos adotá-las como referência para verificação dos efeitos antibacterianos destas lectinas.

#### 4.3.4.1. Padronização das concentrações de PmB em *E. coli* O86

Inicialmente procuramos caracterizar a sensibilidade das *E. coli* O86 a PmB, bem como realizar um controle de qualidade de nossa preparação deste antibiótico comparando com *E. coli* NCTC 13846, uma linhagem de referência à resistência à PmB (Doumith et al. 2016), através da determinação da MIC de PmB (0,25 a 2 µg/mL) nessas bactérias por macrodiluição em caldo. As MICs de PmB obtidas para *E. coli* O86 e *E. coli* NCTC 13846 foram 0,2 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente (Figura 21a), demonstrando que *E. coli* O86 não apresenta resistência intrínseca à ação deste antibiótico, sendo, portanto, passível para ser utilizada como modelo para investigações dos mecanismos de resistência a AMPs.

A partir deste resultado, realizamos uma curva de concentração de PmB (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 µg/mL) em *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$ , como forma de verificarmos concentrações bactericidas e subletais deste antibiótico no nosso modelo de contagem de UFC para 20 minutos de incubação. As concentrações de 1 e 2 µg/mL desse antibiótico provocaram perda de viabilidade para abaixo de um limite detectável em porcentagem em ambas as bactérias, enquanto a concentração de 0,5 µg/mL para aproximadamente 60% em *E. coli* O86 selvagem e 40% em *E. coli* O86  $\Delta waaL$  (Figura 21b). Além disso, as concentrações de 0,1 e 0,2 µg/mL não provocaram perda de viabilidade para as duas bactérias (Figura 21b). A partir das curvas obtidas, foram adotadas para os experimentos subsequentes em *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$  as concentrações de PmB maiores que 0,5 µg/mL como bactericidas, que funcionariam como padrão de verificação dos mecanismos de resistência a AMPs, bem como 0,2 e 0,1 µg/mL como concentrações não-letais deste antibiótico.



**Figura 21. Determinação da concentração inibitória mínima e curva de concentração de PmB em *E. coli* O86.** (a) Determinação da MIC de PmB (0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 µg/mL) em *E. coli* O86 e *E. coli* NCTC 13846 por macrodiluição em caldo. (b) Curva de concentração de PmB. *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$  ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) foram incubadas com PBS ou PmB (0,1; 0,2; 0,5; 1,0 ou 2,0 µg/mL) por 20 minutos a 180 rpm e 37 °C. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra. \*\*\* $p < 0,0001$  em relação aos controles tratados com PBS e # $p < 0,05$  em relação ao mesmo tratamento na bactéria selvagem.

#### 4.3.4.2. Influência da inibição por altas concentrações de $Mg^{2+}$ nos efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86

Definidas as concentrações de PmB acima de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  como bactericidas em nosso modelo com *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$ , escolhemos tais concentrações (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{g/mL}$  de PmB) como controle em um experimento de determinação dos efeitos antibacterianos de Gal-4 (1 e 5  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (10 e 40  $\mu\text{M}$ ) na presença de  $Mg^{2+}$  (20 mM). A presença de altas concentrações deste cátion bivalente inibe a atividade de PmB e AMPs por meio de blindagem da carga negativa dos fosfatos do LPS, impedindo assim a interação desses agentes na membrana externa bacteriana e, conseqüentemente, seus efeitos bactericidas (Newton 1953; C. C. Chen e Feingold 1972).

Conforme esperado, a presença de  $Mg^{2+}$  (20 mM) inibiu a atividade de PmB tanto para *E. coli* O86 como  $\Delta waaL$ , já que apenas 4,0  $\mu\text{g/mL}$  deste antibiótico foi capaz de reduzir a viabilidade das bactérias na presença do cátion (Figura 22). Entretanto, a presença de  $Mg^{2+}$  não interferiu nas atividades de Gal-4 (1 e 5  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (40  $\mu\text{M}$ ) em *E. coli* O86. Já em *E. coli* O86  $\Delta waaL$ , as galectinas não reduziram sua viabilidade tanto na presença quanto ausência de  $Mg^{2+}$  (Figura 22).

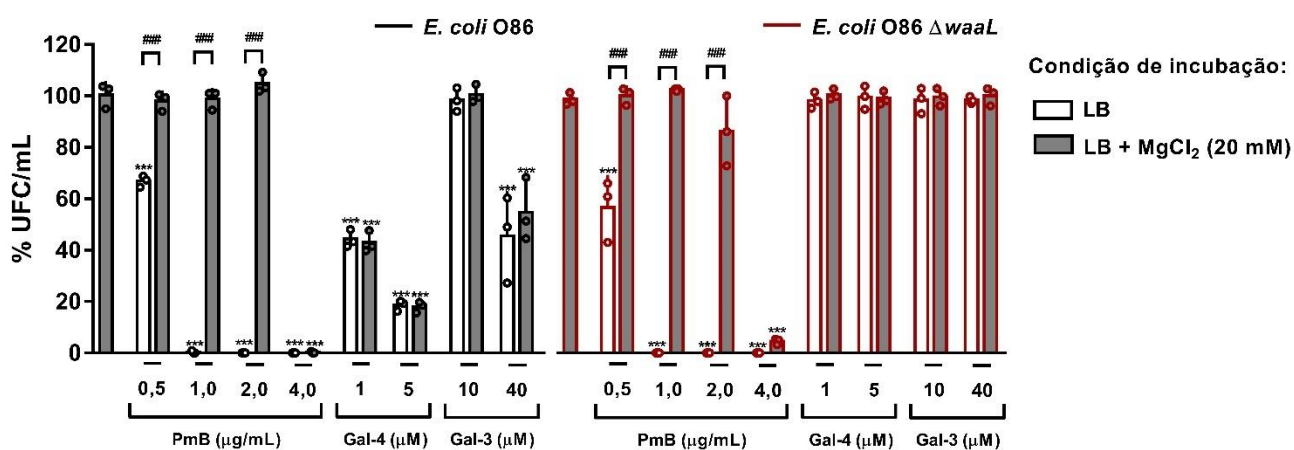


Figura 22. Os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 não são inibidos com a presença de altas concentrações de  $Mg^{2+}$ . Curvas de concentração de PmB (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\mu\text{g/mL}$ ), Gal-4 (1 e 5  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (10 e 40  $\mu\text{M}$ ), na presença e ausência de  $Mg^{2+}$  (20 mM), para *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$ . As incubações foram realizadas por 20 minutos a 180 rpm e 37 °C. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra. \*\*\* $p < 0,0001$  em relação aos controles tratados com PBS e ### $p < 0,0001$  em relação ao mesmo tratamento na presença de  $Mg^{2+}$ .

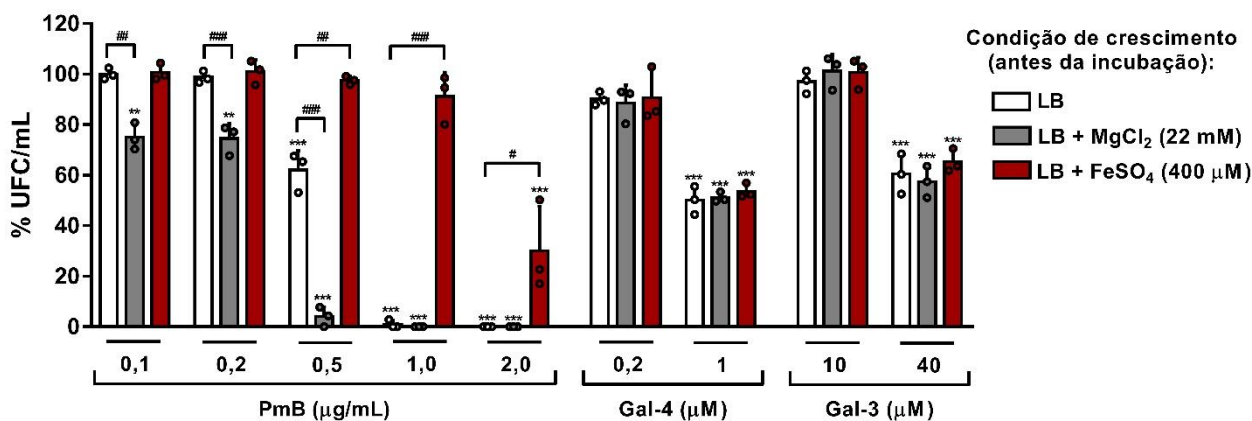
#### 4.3.4.3. Influência dos sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B nos efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3

Ao verificarmos que a presença de 20 mM de  $Mg^{2+}$  não interferiu na atividade antibacteriana de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86, nos questionamos se mecanismos de resistência bacterianos que dificultam a interação de AMPs no LPS interfeririam na atividade destas lectinas. As bactérias gram-negativas possuem mecanismos cromossômicos que protegem da interação com AMPs, por meio da ativação dos sistemas de dois componentes que funcionam tanto na captação de sinais físico-químicos do ambiente externo como na ativação de genes que promovem alterações bioquímicas no LPS e na composição da membrana bacteriana (Z. Yu et al. 2015; H. D. Chen e Groisman 2013).

O sistema de dois componentes PhoP/Q é ativado a baixas concentrações de  $Mg^{2+}$  e é inibido em altas concentrações deste cátion. Considerando que o meio LB apresenta uma concentração baixa de  $Mg^{2+}$ , de 30 a 200  $\mu M$  (Neidhardt, Bloch, e Smith 1974; Christensen et al. 2017), que é suficiente para uma ativação média do sistema PhoP/Q (García Vescovi, Soncini, e Groisman 1996), uma incubação com altas concentrações de  $Mg^{2+}$  (22 mM) desativa esse sistema tornando assim a bactéria sensível à ação de AMPs (García Vescovi, Soncini, e Groisman 1996). Ainda, o sistema de dois componentes PmrA/B é ativado por diversas condições, entre elas a presença de altas concentrações de íons  $Fe^{3+}$  (Wösten et al. 2000), e protege da ação desses peptídeos por meio da incorporação de alterações químicas nos fosfatos do LPS (Z. Yu et al. 2015).

Dessa forma, realizamos um ensaio de perda de viabilidade para PmB, Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86 que, anteriormente ao experimento, cresceram em meio LB na presença ou ausência de  $MgCl_2$  (22 mM), que desativa PhoP/Q, ou  $FeSO_4$  (400  $\mu M$ ), que ativa PmrA/B, respectivamente tornando as bactérias sensíveis e resistentes à ação de PmB (García Vescovi, Soncini, e Groisman 1996; Wösten et al. 2000). Vale notar ainda que a presença de oxigênio no meio de crescimento oxida rapidamente  $Fe^{2+}$  em  $Fe^{3+}$  (Wösten et al. 2000), justificando a escolha de  $FeSO_4$  como fonte desse cátion em nossos experimentos. Quando atingida a  $D.O_{600nm}$  correspondente a  $1,25 \times 10^8$  UFC/mL durante o inóculo, as bactérias foram centrifugadas a 5000 x g por 5 minutos a 25 °C, os sobrenadantes foram retirados e meio LB foi adicionado. As *E. coli* O86 foram então diluídas em meio LB e incubadas com PmB (0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2  $\mu g/mL$ ), Gal-4 (0,2 e 1  $\mu M$ ) e Gal-3 (10 e 40  $\mu M$ ).

Conforme observado para os grupos tratados com PmB, os crescimentos da cultura de *E. coli* O86 na presença de  $MgCl_2$  e  $FeSO_4$ , respectivamente sensibilizaram e tornaram as bactérias resistentes à ação desse antibiótico (Figura 23). Diferentemente do que ocorreu nos grupos controles crescidos apenas em meio LB, as suspensões de *E. coli* O86 cultivadas na presença  $MgCl_2$ , (22 mM) tiveram suas viabilidades reduzidas para aproximadamente 75%, 75% e 10% quando tratadas com 0,1; 0,2 e 0,5  $\mu g/mL$  de PmB, respectivamente. Já nos grupos crescidos na presença de  $FeSO_4$  (400  $\mu M$ ), as concentrações de 0,5 e 1  $\mu g/mL$  de PmB, que foram bactericidas nos controles crescidos na ausência desse sal, não promoveram redução significativa de viabilidade, enquanto 2  $\mu g/mL$  desse antibiótico reduziu a viabilidade de *E. coli* O86 para aproximadamente 30% (Figura 23). Dessa forma, os controles com PmB indicaram que o modelo de desativação de PhoP/Q e ativação de PmrA/B por crescimento na presença desses agentes foi bem sucedido, já que as bactérias apresentaram sensibilidade e resistência à ação desse antibiótico nessas condições. Entretanto, não observamos qualquer alteração tanto para a ação de Gal-4 quanto Gal-3 nesse modelo (Figura 23), indicando que essas galectinas agem independentemente das alterações fenotípicas promovidas pela ativação dos sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B.



**Figura 23. Os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 independentemente do estado de ativação dos sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B.** Suspensões de *E. coli* O86 ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) foram cultivadas em meio LB, LB suplementado com  $MgCl_2$  (22 mM), ou LB suplementado  $FeSO_4$  (400  $\mu M$ ). As bactérias foram então centrifugadas, lavadas e diluídas em LB, e incubadas com PBS, PmB (0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2  $\mu g/mL$ ) Gal-4 (0,2 e 1  $\mu M$ ) e Gal-3 (10 e 40  $\mu M$ ) por 20 minutos a 180 rpm e 37 °C. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra. \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,0001 em relação aos controles com PBS e #p<0,05; ##p<0,001; ###p<0,0001 onde indicado.

#### 4.3.4.4. Influência do gene *mcr-1* nos efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3

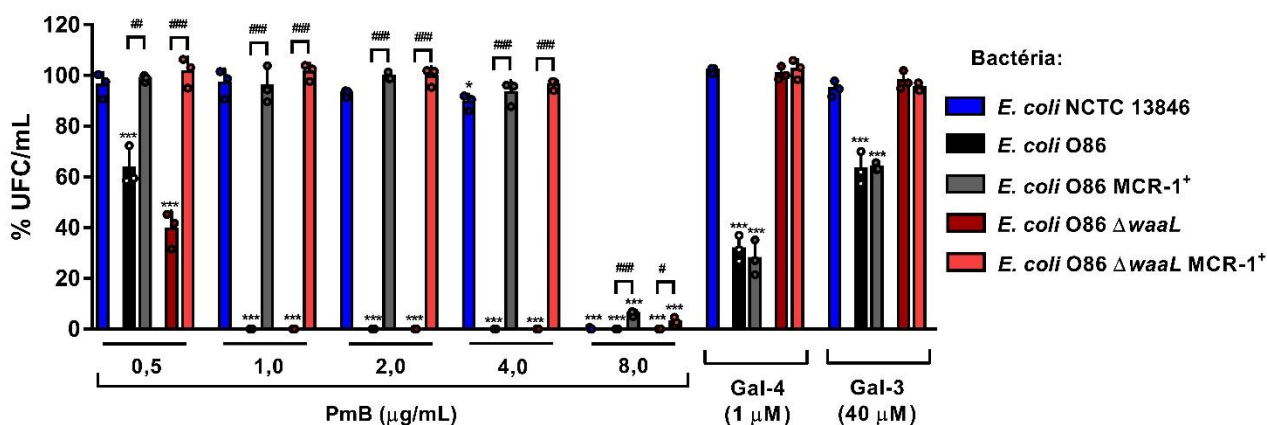
Verificando que os efeitos de Gal-4 e Gal-3 independem da ativação dos sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B que, dentre muitas alterações, regulam a ativação de genes que transferem grupos L-Ara4N e pEtN em grupos fosfato presentes no lipídeo A do LPS, resolvemos investigar se estas galectinas promoveriam a morte de bactérias que apresentassem o gene de resistência *mcr-1*. Esse gene, desconhecido até 6 anos atrás, é transferido horizontalmente entre bactérias na clínica e promove a transferência de pEtN no fosfato dos lipídeos A das bactérias gram-negativas de forma constitutiva, tornando-as resistentes à ação de PmB independentemente da ativação dos sistemas de dois componentes (Liu et al. 2016; 2017)

Dessa forma, resolvemos investigar se os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 ocorreriam em bactérias que apresentam o gene *mcr-1*. Considerando que galectinas só promovem os efeitos em bactérias que apresentam glicanas específicas, nossa estratégia foi transformar as *E. coli* O86 e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  com o plasmídeo pMQ124-*mcr-1* que concede este gene de resistência e promove a alteração do LPS (Liu et al. 2017). O preparo de *E. coli* O86 e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  eletrocompetentes, assim como a transformação destas com o plasmídeo pMQ124-*mcr-1* por eletroporação estão descritos na seção 3.5. deste trabalho. A transformação foi bem sucedida, já que obtemos clones que cresceram em meio LB com adição conjunta do antibiótico de seleção do plasmídeo pMQ124 (gentamicina - 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e da concentração inibitória de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PmB para essas bactérias (Figura 21a). Ainda, a propriedade de crescer nessas condições só ocorreu nas bactérias competentes que foram eletroporadas na presença do plasmídeo pMQ124-*mcr-1*, não ocorrendo naquelas que receberam o controle com  $\text{H}_2\text{O}$ .

Obtidas as *E. coli* O86 selvagem e  $\Delta waaL$  que apresentam o gene *mcr-1*, realizamos um experimento com PmB (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Gal-4 (1  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (40  $\mu\text{M}$ ) para cinco bactérias: *E. coli* NCTC 13846, que apresenta o gene *mcr-1* (Doumith et al. 2016); *E. coli* O86; *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup>; *E. coli* O86  $\Delta waaL$  e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup>. Nossos resultados demonstraram que as bactérias transformadas com o plasmídeo pMQ124-*mcr-1*, *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup>, não sofreram redução de viabilidade para até 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PmB, de forma semelhante à *E. coli* NCTC 13846, referência de resistência à ação deste antibiótico. Esses resultados contrastam para as formas sem plasmídeo dessas bactérias, cujas viabilidades foram reduzidas para incubações com 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 24). Dessa forma, esses resultados reforçam que a transformação que realizamos foi bem sucedida ao tornar essas



bactérias 16 vezes mais resistentes à ação de PmB, aumentando a máxima concentração não-bactericida de 0,2 para 4 µg/mL. No entanto, ambas as *E. coli* O86 e *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> apresentaram a mesma redução de viabilidade quando incubadas com Gal-4 (1 µM) e Gal-3 (40 µM). Ainda, não houve redução de viabilidade promovida por estas galectinas em *E. coli* NCTC 13846, *E. coli* O86  $\Delta waaL$  e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup> (Figura 24). Sendo assim, nosso conjunto de dados, por meio de diferentes abordagens de promoção de resistência a AMPs, demonstra que os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 independem da interação com o fosfato do lipídeo A do LPS e dos mecanismos convencionais de resistência a estes peptídeos.



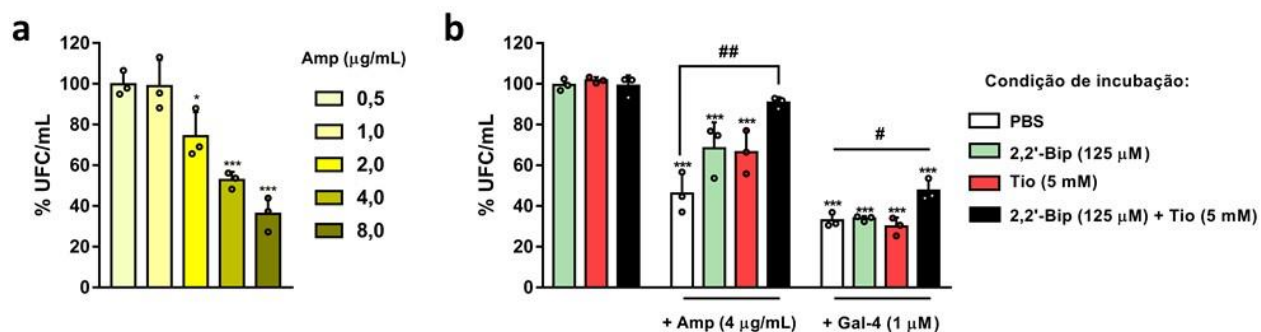
**Figura 24. Atividades antibacterianas de Gal-4 e Gal-3 independem da presença do gene *mcr-1*.** *E. coli* NCTC 13846, *E. coli* O86, *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup>, *E. coli* O86  $\Delta waaL$  e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup> ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) foram incubadas com PmB (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL), Gal-4 (1 µM) e Gal-3 (40 µM) por 20 minutos a 37 °C e 180 rpm. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra. \*\*\*p<0,0001 em relação aos controles com PBS e ##p<0,001; ###p<0,0001 onde indicado.

#### 4.3.5. Influência da reação de Fenton intracelular no efeito bactericida de Gal-4

Tendo verificado que Gal-4 apresenta uma ação bactericida que independe dos mecanismos de resistência a AMPs, resolvemos investigar mecanismos à montante da interação desta lectina com a membrana de *E. coli* O86 e que podem participar do fenômeno de morte promovido por esta lectina. Recentemente, diversos trabalhos levantaram a hipótese que mecanismos de antibióticos bactericidas conduzem a um escape de superóxido da cadeia fosforilativa de elétrons, deslocamento de íons Fe de centros de ferro-enxofre presentes em proteínas intracelulares bacterianas, que por sua vez conduzem à uma reação de Fenton intracelular com produção de radical hidroxil e dano oxidativo (Kohanski et al. 2008; Daniel J. Dwyer et al. 2007; Kohanski et al. 2007; D. J. Dwyer et al. 2014; Kohanski, Dwyer, e Collins 2010). Apesar de não haver consenso sobre a essencialidade desse fenômeno na promoção de morte bacteriana (Keren et al. 2013), diversos efeitos de antibióticos bactericidas são inibidos e/ou atrasados com a adição de tioureia (Tio) e 2,2'-bipiridina (2,2'-Bip), que respectivamente atuam como um agente antioxidante e quelante dos íons  $Fe^{3+}$  e, portanto, inibem a reação de Fenton intracelular (Kohanski et al. 2007; D. J. Dwyer et al. 2014).

Dessa forma, nos questionamos se a ação bactericida de Gal-4 em *E. coli* O86 dependeria da promoção dessa reação e, conseqüentemente, seria inibida com a adição de 2,2'-Bip e Tio. Sendo assim realizamos um experimento com concentrações bactericidas de Gal-4 (1  $\mu$ M - Figura 14a) e de Amp (4  $\mu$ g/mL), obtida por meio de uma curva de concentração em *E. coli* O86 (Figura 25a), junto a 2,2'-Bip (125  $\mu$ M), Tio (5 mM) e a associação dos dois agentes (125  $\mu$ M de 2,2'-Bip + 5 mM de Tio).

A incubação de *E. coli* O86 com Amp (4  $\mu$ g/mL) culminou numa redução de viabilidade para aproximadamente 50%, sendo esse efeito inibido parcialmente com a adição de 2,2'-Bip e Tio (viabilidade de ambas a aproximadamente 65%, não significativo em relação ao grupo tratado isoladamente com Amp) e inibido totalmente com a associação de ambos os agentes (viabilidade de 92%), indicando, portanto, que essas concentrações foram eficientes na inibição da ação deste antibiótico (Figura 25b). Para Gal-4, por sua vez, apenas a adição conjunta de 2,2'-Bip e Tio foi capaz de reduzir parcialmente a redução de viabilidade provocada por Gal-4 de 35% (Gal-4) para 50% (Gal-4 + 2,2'-Bip e Tio - Figura 25b). Esses resultados sugerem que a desencadeamento da reação de Fenton intracelular influencia parcialmente na ação bactericida de Gal-4, diferentemente do que ocorre para Amp nas mesmas condições. Dessa forma, ocorreria um efeito à jusante a partir da ação provocada pela interação de Gal-4 no LPS da membrana de *E. coli* O86.



**Figura 25. O efeito bactericida de Gal-4 é parcialmente inibido por 2,2'-bipiridina e tioureia.** (a) Curva de concentração de Amp (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µg/mL) e (b) associação de Amp (4 µg/mL) e Gal-4 (1 µM) com 2,2'-bipiridina (2,2'-Bip - 125 µM), tioureia (Tio - 5 mM) ou a adição conjunta dos dois agentes (2,2'-Bip 125 µM + Tio 5 mM) em *E. coli* O86 ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) para 20 minutos de incubação a 180 rpm e 37 °C. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  em relação aos controles com PBS e # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,001$  onde indicado.

#### **4.4. Caracterização do potencial sinergismo de galectinas com agentes antimicrobianos em *E. coli* O86**

Tendo avançado na caracterização dos efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86, e definidas as concentrações letais e subletais destas lectinas (Figura 14), nos questionamos se estas poderiam ainda agir em conjunto com outros agentes antimicrobianos na promoção da morte desta bactéria. Dessa forma, nesta seção investigamos a ação de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86 em conjunto com os seguintes agentes: *i*) PmB; *ii*) adição conjunta de Gal-4 + Gal-3 e *iii*) ampicilina e ciprofloxacino. Ainda, avaliamos o potencial antibacteriano de Gal-3C em adições isoladas ou em conjunto com PmB e Gal-4.

##### **4.4.1. Associação de Gal4 e Gal-3 com PmB em *E. coli* O86**

Nossos resultados anteriores demonstraram que Gal-4 e Gal-3 independem dos mecanismos de resistência que inibem a ação de PmB em *E. coli* O86. Ainda, observamos que tanto as galectinas quanto PmB promovem seus efeitos a partir da interação na molécula de LPS, porém em sítios distintos: enquanto Gal-4 e Gal-3 dependem da interação com o O-PS para promoção de seus efeitos, PmB interage com o lipídeo A presente na membrana externa bacteriana (Z. Yu et al. 2015). Sendo assim, e por interagirem com o mesmo alvo, nos questionamos se Gal-4 e Gal-3 agiriam sinergicamente com PmB na promoção de morte de *E. coli* O86.

Como forma de respondermos a essa pergunta, realizamos um experimento com a presença e ausência de uma concentração subletal de PmB (0,2 µg/mL), determinada anteriormente em nosso modelo (Figura 21b), junto a concentrações letais e subletais de Gal-4 (0,2 e 1 µM) e Gal-3 (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40 µM) em *E. coli* O86. Ainda, realizamos controles com presença e ausência de PmB em *E. coli* O86 selvagem com Gal-1 (20 e 40 µM), que é uma galectina que não se liga ao sorotipo O86 (Stowell et al. 2010), com anticorpo anti antígeno eritrocitário do grupo B (Anti-B - 5 e 40 µM), que é uma proteína não-lectinínica que se liga ao mesmo alvo O-PS (Springer e Horton 1969; SPRINGER, HORTON, e FORBES 1959; Stowell et al. 2010) e ainda controles em *E. coli* O86  $\Delta waaL$  com Gal-4 (0,2 e 1 µM) e Gal-3 (20 e 40 µM). Definimos o efeito como sinérgico quando verificada diferença estatística da adição conjunta em relação aos controles isolados de cada amostra.

Observamos que Gal-1 e Anti-B não promoveram a redução de viabilidade de *E. coli* O86 para nenhuma das concentrações testadas. Além disso, a concentração subletal de PmB (0,2 µg/mL), quando adicionada concomitantemente à concentração subletal de Gal-4 (0,2 µM),

assim como a maioria das concentrações subletais de Gal-3 (1, 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) reduziu a viabilidade de *E. coli* O86 para aproximadamente 60% (Figura 26a). O efeito sinérgico não foi observado quando adicionadas concentrações letais de Gal-4 (1  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (40  $\mu\text{M}$ ), assim como na concentração subletal de 0,2  $\mu\text{M}$  de Gal-3, nas duas concentrações testadas de Gal-1 (20 e 40  $\mu\text{M}$ ) e de Anti-B (5 e 40  $\mu\text{M}$ ). Ainda, a associação de PmB com Gal-4 (0,2 e 1  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (20 e 40  $\mu\text{M}$ ) não provocou a redução de viabilidade de *E. coli* O86  $\Delta waaL$  (Figura 26a). Tais resultados sugerem que concentrações subletais de Gal-4 e Gal-3 atuam sinergicamente com 0,2  $\mu\text{g/mL}$  de PmB na promoção de morte de *E. coli* O86. Ainda, a ligação lectínica específica é necessária para a redução de viabilidade, já que esta não foi observada para associações com Gal-1 e Anti-B na bactéria selvagem e para Gal-4 e Gal-3 na bactéria mutante.

Verificando esse efeito sinérgico, nos questionamos se Gal-4 e Gal-3 promoveriam tais efeitos mesmo em ambientes resistentes à ação de PmB, nos modelos descritos na seção 4.3.4. Sendo assim, realizamos um experimento com presença de  $\text{Mg}^{2+}$  (20 mM) durante a incubação com 4 concentrações subletais de PmB (0,2; 0,5; 1,0 e 2,0  $\mu\text{g/mL}$ ) determinadas anteriormente (Figura 22). Essas concentrações foram adicionadas em conjunto com concentrações subletais de Gal-4 (0,2  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (0,2; 1; 5; 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) em *E. coli* O86. Ainda, realizamos controles com adições conjuntas de Gal-1 (20 e 40  $\mu\text{M}$ ) para a máxima concentração não-bactericida de PmB na presença de  $\text{Mg}^{2+}$  na bactéria selvagem (2  $\mu\text{g/mL}$ ) e com adições conjuntas de Gal-4 (0,2  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (20  $\mu\text{M}$ ) junto à máxima não bactericida em *E. coli* O86  $\Delta waaL$  (1  $\mu\text{g/mL}$ ).

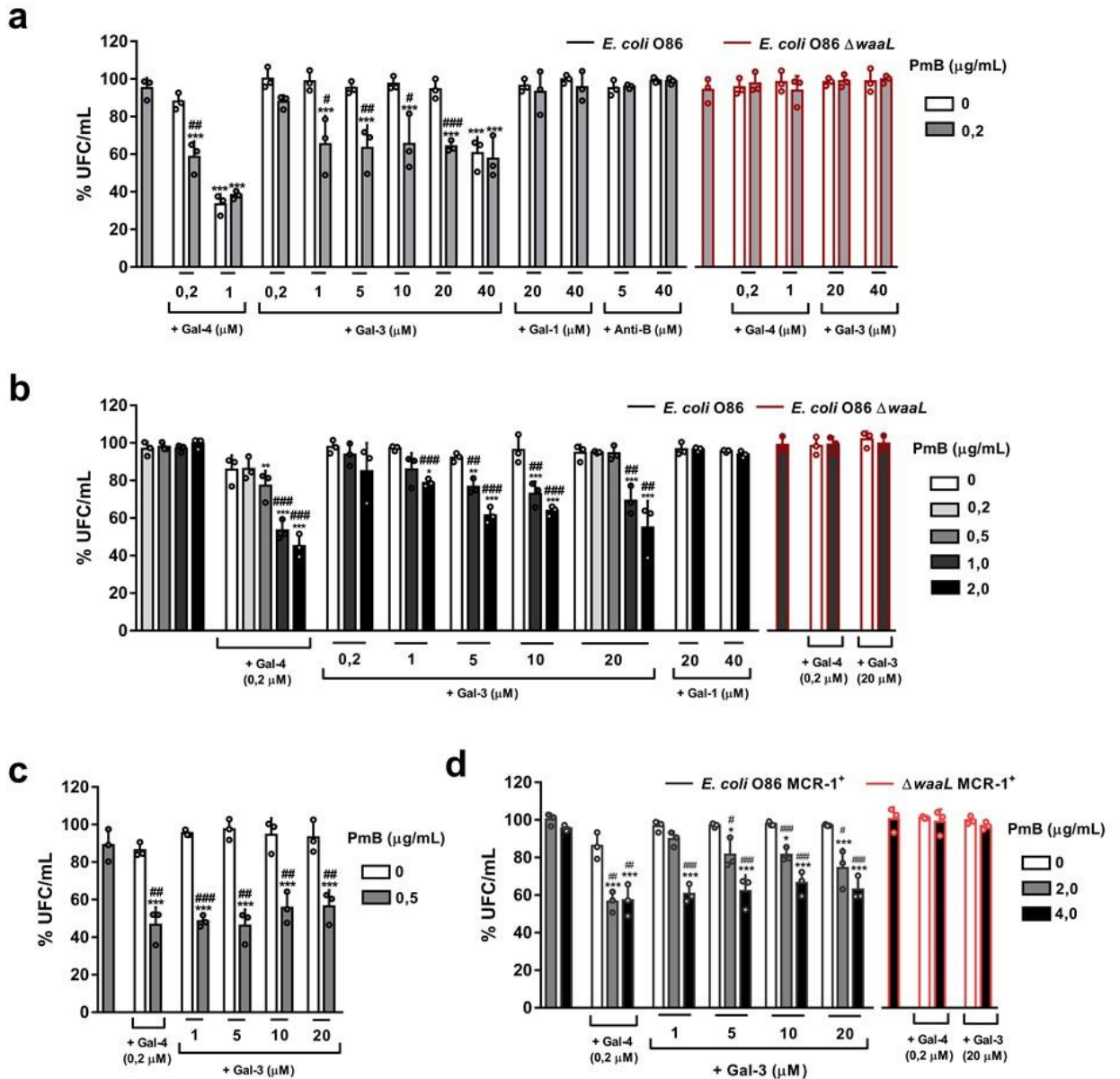
Nossos resultados indicam que, para as concentrações máximas não-bactericidas de PmB (1 e 2  $\mu\text{g/mL}$ ) na presença de  $\text{MgCl}_2$  (20 mM), houve ação sinérgica junto a concentrações subletais de Gal-4 (0,2  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (1, 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  – Figura 26b). Além disso, Gal-4 (0,2  $\mu\text{M}$ ) adicionado junto a 1 e 2  $\mu\text{g/mL}$  de PmB reduziu a viabilidade de *E. coli* O86 selvagem para, respectivamente, 55 e 45%. Já para Gal-3, 1  $\mu\text{M}$  dessa lectina junto a PmB (2  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziu a viabilidade para aproximadamente 80%; enquanto para as demais concentrações de Gal-3 (5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) as viabilidades das suspensões foram reduzidas junto a PmB (1  $\mu\text{g/mL}$ ) para: 5  $\mu\text{M}$  (80%); 10  $\mu\text{M}$  (80%); 20  $\mu\text{M}$  (75%) e junto a PmB (2  $\mu\text{g/mL}$ ) para: 5  $\mu\text{M}$  (65%); 10  $\mu\text{M}$  (65%); 20  $\mu\text{M}$  (50%), respectivamente. Entretanto, não foi observado efeito sinérgico para as concentrações de 0,2 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de PmB junto a essas concentrações de galectinas na presença de 20 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Figura 26b), como observado anteriormente na ausência desse cátion (Figura 26a). Ainda, não houve redução de viabilidade observada para associações com Gal-1 na bactéria selvagem e com Gal-4 e Gal-3 na bactéria mutante. Esses resultados sugerem, portanto, que as concentrações subletais de Gal-4 e Gal-3 atuam em sinergismo com PmB,

mesmo na presença de 20 mM de  $MgCl_2$ , porém apenas para maiores concentrações subletais deste antibiótico.

Além disso, associamos concentrações subletais de Gal-4 (0,2  $\mu M$ ) e Gal-3 (1; 5; 10 e 20  $\mu M$ ) com concentrações subletais de PmB em *E. coli* O86 após crescimento com  $FeSO_4$  (400  $\mu M$ ), que ativa o sistema de dois componentes PmrA/B, e em *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup>. As concentrações de PmB escolhidas nesses experimentos foram de 0,5  $\mu g/mL$  para *E. coli* O86 após crescimento com  $FeSO_4$ , assim como 1,0 e 2,0  $\mu g/mL$  para *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup>, determinadas anteriormente (Figuras 23 e 24).

Observamos que em *E. coli* O86 com o sistema PmrA/B ativado todas as concentrações de galectinas testadas quando adicionadas concomitantemente a 0,5  $\mu g/mL$  de PmB reduziram a viabilidade de *E. coli* O86 selvagem para aproximadamente 50% (Figura 26c). Ainda, Gal-4 (0,2  $\mu M$ ) em associação a PmB (1,0 e 2,0  $\mu g/mL$ ) em *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> reduziu a viabilidade para 60%. Além disso, Gal-3 (1, 5, 10 e 20  $\mu M$ ) em conjunto com PmB (2,0  $\mu g/mL$ ) reduziu as viabilidades de todos os grupos de *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> para 60%, mas em conjunto com 1,0  $\mu g/mL$  deste antibiótico reduziu significativamente apenas para 5  $\mu M$  (80%) 10  $\mu M$  (80%) e 20  $\mu M$  (75%) desta lectina (Figura 26d). Essas reduções de viabilidade por parte de Gal-4 e Gal-3 não foram observadas em *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup> (Figura 26d – à direita).

Dessa forma, esse conjunto de dados sugere que Gal-4 e Gal-3 potencializam a ação de PmB em *E. coli* O86 de forma dependente da interação com a porção O-PS do LPS. Ainda, essa associação reduz a viabilidade mesmo em condições resistentes à ação de AMPs, mas apenas para concentrações próximas às máximas não-bactericidas.

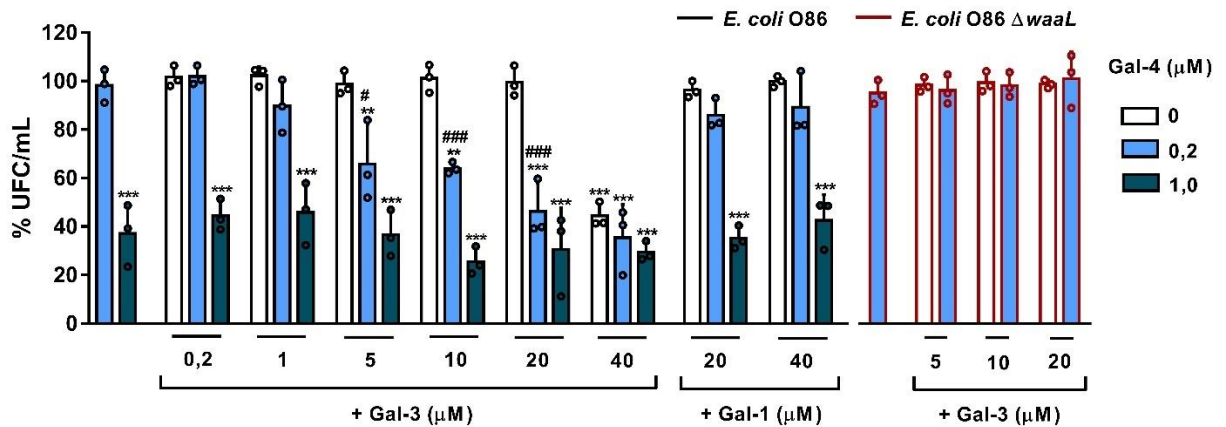


**Figura 26. Gal-4 e Gal-3 potencializam, de forma dependente da presença do O-PS, os efeitos bactericidas de concentrações subletais de PmB em *E. coli* O86 mesmo em condições de resistência à ação de AMPs. (a)** Adições isoladas ou concomitantes de PmB (0,2 μg/mL) com Gal-4 (0,2 e 1 μM), Gal-3 (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40 μM), Gal-1 (20 e 40 μM) e Anti-B (5 e 40 μM) em *E. coli* O86 e de Gal-4 (0,2 e 1 μM) e Gal-3 (20 e 40 μM) em *E. coli* O86  $\Delta waaL$ . **(b)** Adições concomitantes na presença de Mg<sup>2+</sup> (20 mM) de PmB (0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 μg/mL) com Gal-4 (0,2 e 1 μM), Gal-3 (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40 μM) e Gal-1 (20 e 40 μM) em *E. coli* O86 e de Gal-4 (0,2 μM) e Gal-3 (20 μM) em *E. coli* O86  $\Delta waaL$ . **(c)** Adições concomitantes de PmB (0,5 μg/mL) com Gal-4 (0,2 μM) e Gal-3 (1, 5, 10 e 20 μM) em *E. coli* O86 crescidas em LB suplementado com FeSO<sub>4</sub> (400 μM) e **(d)** Adições concomitantes de PmB (1,0 e 2,0 μg/mL) com Gal-4 (0,2 μM) e Gal-3 (1, 5, 10 e 20 μM) em *E. coli* O86 MCR-1<sup>+</sup> e *E. coli* O86  $\Delta waaL$  MCR-1<sup>+</sup>. Suspensões de bactérias na concentração de 1 x 10<sup>7</sup> UFC/mL foram incubadas por 20 minutos a 37 °C e 180 rpm em todos os grupos. Dados expressam a média ± desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,0001 em relação aos controles com PBS e #p<0,05; ##p<0,001; ###p<0,0001 em relação aos controles isolados.

#### 4.4.2. Avaliação do potencial sinergismo de Gal-4 e Gal-3 em *E. coli* O86

Considerando que tanto Gal-4 e Gal-3, que se ligam no mesmo O-PS em *E. coli* O86, potencializaram a ação de PmB, que interage com o lipídeo A do LPS, nos questionamos se a adição conjunta de ambas as galectinas ocasionaria também em um sinergismo na promoção de morte da bactéria. Dessa forma, realizamos um experimento nas mesmas condições de tempo e incubação na presença e ausência de concentrações não-letais e letais de Gal-4 (0,2 e 1  $\mu$ M) junto a Gal-3 (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40  $\mu$ M) e Gal-1 (20 e 40  $\mu$ M) em *E. coli* O86. Ainda, realizamos a adição conjunta de Gal-4 (0,2  $\mu$ M) com Gal-3 (20 e 40  $\mu$ M) em *E. coli* O86  $\Delta waaL$ .

Em *E. coli* O86, adições concomitantes de Gal-3 com 0,2  $\mu$ M de Gal-4 apresentaram sinergismo com as concentrações de 5, 10 e 20  $\mu$ M de Gal-3 (Figura 27). Entretanto, não foi observado esse efeito tanto para outras concentrações subletais de Gal-3 (0,2 e 1  $\mu$ M), quanto para a letal (40  $\mu$ M) junto a 0,2  $\mu$ M de Gal-4, assim como não foi observado qualquer efeito modulatório com a concentração letal de 1  $\mu$ M de Gal-4. Além disso, o sinergismo com Gal-4 não foi observado em conjunto com Gal-1 na bactéria selvagem assim como de Gal-4 (0,2  $\mu$ M) com Gal-3 (5, 10 e 20  $\mu$ M) em *E. coli* O86  $\Delta waaL$  (Figura 27). Sendo assim, estes resultados sugerem que tal efeito sinérgico deriva da interação específica de concentrações subletais de Gal-4 e Gal-3 com o mesmo alvo O-PS de *E. coli* O86.



**Figura 27. Gal-4 e Gal-3 apresentam efeitos sinérgicos na redução de viabilidade de *E. coli* O86 de forma dependente da presença do O-PS.** Adições isoladas ou concomitantes de Gal-4 (0,2 e 1  $\mu$ M) com Gal-3 (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40  $\mu$ M) ou Gal-1 (20 e 40  $\mu$ M) foram realizadas em *E. coli* O86. Ainda, Gal-4 (0,2  $\mu$ M) foi associada com Gal-3 (5, 10 e 20  $\mu$ M) em *E. coli* O86  $\Delta waaL$ . Suspensões de bactérias a  $1 \times 10^7$  UFC/mL foram incubadas por 20 minutos a 180 rpm e 37 °C. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra. \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,0001 em relação aos controles com PBS e #p<0,05 e ###p<0,0001 em relação aos controles isolados.

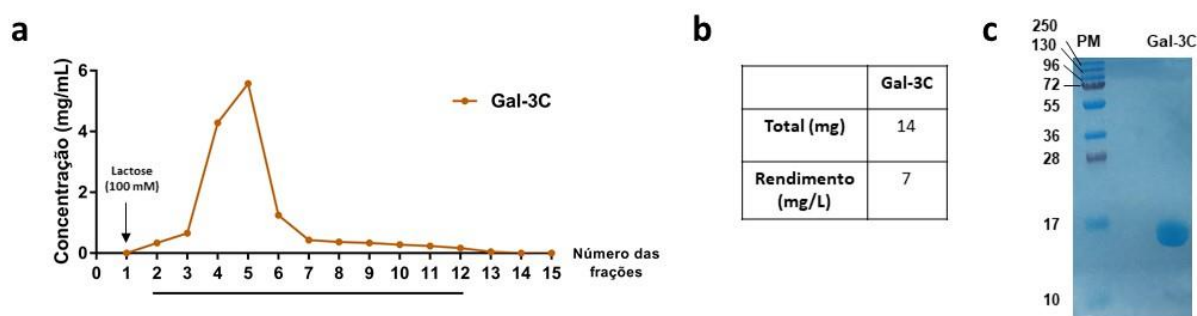


#### 4.4.3. Caracterização dos efeitos antibacterianos de Gal-3C em *E. coli* O86

Observada a capacidade de Gal-3 (40  $\mu$ M) em reduzir a viabilidade de *E. coli* O86, bem como de concentrações subletais dessa lectina em associar-se com PmB e Gal-4 na promoção de morte desta bactéria, nos questionamos se a forma inteira desta proteína é necessária para essas atividades. A Gal-3 é uma proteína que possui um domínio globular C-terminal que contém o seu CRD. Além disso, apresenta uma cauda N-terminal flexível que possui papel fundamental na oligomerização e responsável para muitos efeitos biológicos promovidos por esta lectina (Kuwabara e Liu 1996; Fermino et al. 2011). Dessa forma, resolvemos investigar os efeitos da forma truncada de Gal-3, que consiste apenas no domínio C-terminal com o CRD (Gal-3C), em *E. coli* O86 para adições isoladas ou em associação com PmB e Gal-4.

##### 4.4.3.1. Produção do lote de Gal-3C recombinante

A obtenção da Gal-3C utilizada para estes ensaios foi realizada por produção heteróloga em sistema procarioto e purificação por afinidade em coluna de  $\alpha$ -lactose-agarose, de forma semelhante às outras galectinas que utilizamos neste trabalho (metodologia descrita na seção 3.1.). Dessa forma, obtemos frações eluídas da coluna cromatográfica por afinidade com lactose (Figura 28a), que foram juntadas em um lote único de aproximadamente 14 mg de Gal-3C e congeladas em freezer -80 °C até o momento de uso (Figura 28b). A verificação da homogeneidade do lote por SDS-PAGE mostra que as preparações estavam homogêneas, com uma banda única ao redor de 17 kDa (Figura 28c), estando este resultado de acordo com a massa teórica de Gal-3C (16,16 kDa).



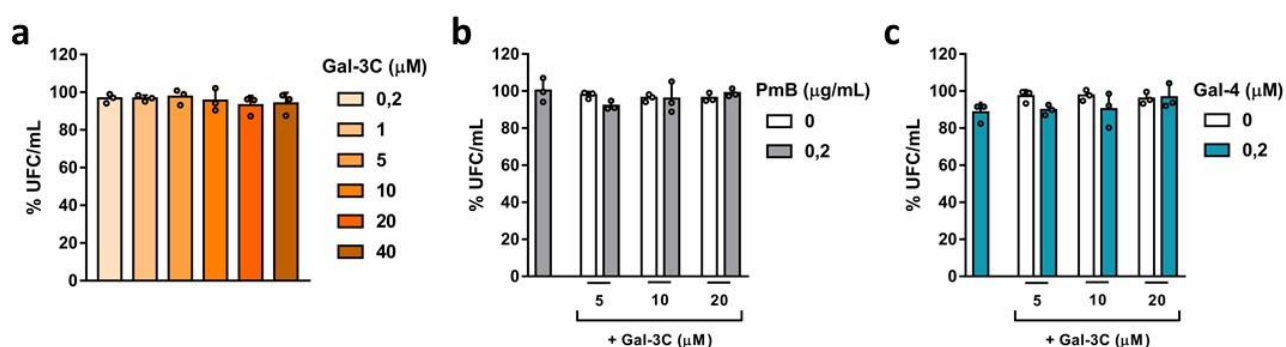
**Figura 28. Produção e verificação da homogeneidade do lote de Gal-3C recombinante.** (a) Leitura das frações eluídas em coluna de  $\alpha$ -lactose-agarose de Gal-3C. O perfil de eluição foi monitorado pela medida de absorvância de 280 nm e as concentrações expressas no eixo y foram baseadas nos parâmetros de  $\epsilon$  e MM de cada proteína. A linha paralela ao eixo x indica as frações que foram reunidas, divididas em alíquotas de 1 mL e armazenadas em freezer -80 °C. (b) Tabela com dados de rendimento total e (c) perfil eletroforético (SDS-PAGE) de amostras dos lotes de Gal-3C purificadas. PM – Marcadores de peso molecular.

#### 4.4.3.2. Incubação com Gal-3C isoladamente ou em associação com PmB e Gal-4 em *E. coli* O86

Obtidas as formas truncadas Gal-3C, realizamos inicialmente uma curva de concentração desta lectina (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40  $\mu\text{M}$ ) em *E. coli* O86 ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) por meio de incubação por 20 minutos a 37 °C e 180 rpm. Podemos observar que, diferentemente do que ocorre com as mesmas concentrações de Gal-3 para *E. coli* O86 (Figura 14b), a concentração de 40  $\mu\text{M}$  de Gal-3C não reduziu a viabilidade desta bactéria (Figura 29a).

Ainda, resolvemos avaliar a associação de Gal-3C (5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) com concentrações subletais de PmB (0,2  $\mu\text{g/mL}$ ) e de Gal-4 (0,2  $\mu\text{M}$ ) no mesmo modelo. Observamos que nenhuma associação com PmB (Figura 29b) e Gal-4 (Figura 29c) foi capaz de reduzir a viabilidade de *E. coli* O86, como observado anteriormente para as mesmas concentrações da forma inteira desta lectina (Figuras 26 e 27).

Sendo assim, acreditamos que a forma inteira da Gal-3 é necessária para promoção de suas propriedades antibacterianas, tanto para redução da viabilidade de *E. coli* O86 a 40  $\mu\text{M}$ , como suas associações com concentrações subletais de PmB e Gal-4, sugerindo, portanto, que a capacidade de oligomerização desta lectina é importante nestes efeitos.



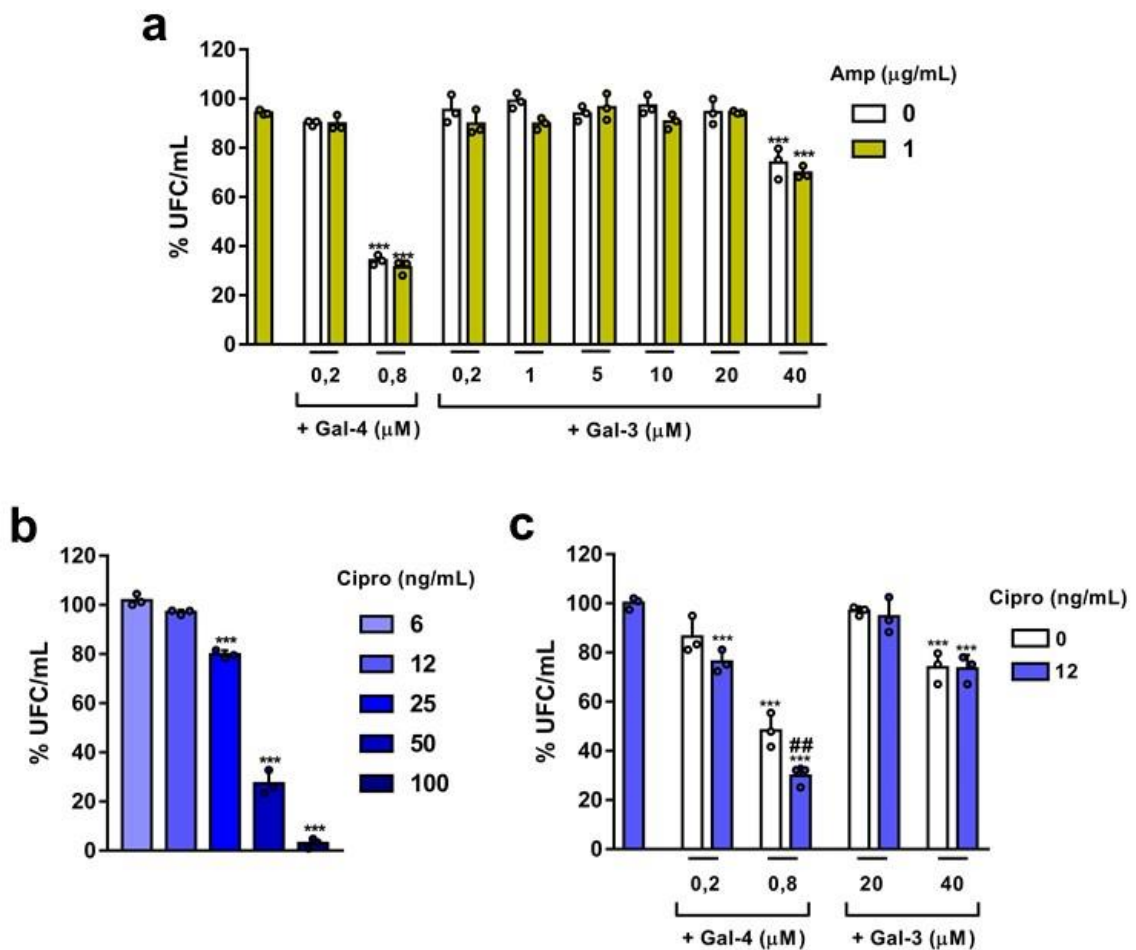
**Figura 29. Gal-3C não reduz a viabilidade de *E. coli* O86 e não apresenta sinergismo com PmB e Gal-4.** (a) Curva de concentração de Gal-3C (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40  $\mu\text{M}$ ) em *E. coli* O86. Adições isoladas ou associações de Gal-3C (5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) com (b) PmB (0,2  $\mu\text{g/mL}$ ) e (c) Gal-4 (0,2  $\mu\text{M}$ ) em *E. coli* O86. Suspensões de bactérias a  $1 \times 10^7$  UFC/mL foram incubadas por 20 minutos a 180 rpm e 37 °C. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra.

#### 4.4.4. Associação de Gal-4 e Gal-3 com ampicilina e ciprofloxacino

Tendo caracterizado a associação de Gal-4 e Gal-3 com agentes que se ligam ao LPS, resolvemos investigar a associação com outros agentes bactericidas que agem independentemente dessa interação. Dessa forma, realizamos um experimento de associação de concentrações subletais e letais de Gal-4 (0,2 e 0,8  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40  $\mu\text{M}$ ) junto a uma concentração subletal de Amp (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), determinada anteriormente (Figura 25a). Observamos que, diferentemente do que ocorre para PmB e associações entre Gal-4 e Gal-3, não houve sinergismo para nenhuma das concentrações testadas de galectinas junto à concentração subletal de Amp (Figura 30a).

Ainda, resolvemos avaliar o possível efeito sinérgico de Gal-4 e Gal-3 com ciprofloxacino (Cipro). Realizamos primeiramente uma curva de concentração deste antibiótico em *E. coli* O86, como forma de determinarmos a máxima concentração não-letal em nosso modelo. Observamos que 100, 50 e 25 ng/mL de Cipro reduziram a viabilidade de *E. coli* O86 para respectivamente 5%, 25% e 80% (Figura 30b). No entanto, 12 e 6 ng/mL deste antibiótico não reduziram a viabilidade da bactéria (Figura 30b). Sendo assim, escolhemos a concentração de 12 ng/mL para o experimento subsequente de associação com Gal-4 (0,2 e 0,8  $\mu\text{M}$ ) e Gal-3 (20 e 40  $\mu\text{M}$ ).

Observamos que de todas as condições testadas, apenas a associação de Cipro (12 ng/mL) com a concentração bactericida de Gal-4 (0,8  $\mu\text{M}$ ) foi capaz reduzir a viabilidade de *E. coli* O86 (Figura 30c), diferentemente do que ocorre para as associações com PmB, entre Gal-4 e Gal-3 e com Amp. Dessa forma, acreditamos que o sinergismo de Gal-4 não se limita a agentes que interagem com o LPS, podendo ocorrer em associação a outros mecanismos antibacterianos em *E. coli* O86.



**Figura 30. O efeito bactericida de Gal-4 em *E. coli* O86 apresenta sinergismo com Cipro. (a)** Incubação de Gal-4 (0,2 e 0,8 µM) e Gal-3 (0,2; 1; 5; 10; 20 e 40 µM) com a presença e ausência de Amp (1 µg/mL) em *E. coli* O86. **(b)** Curva de concentração de Cipro (100, 50, 25, 12 e 6 ng/mL) em *E. coli* O86 e **(c)** associação de Cipro (12 ng/mL) com Gal-4 (0,2 e 0,8 µM) e Gal-3 (20 e 40 µM). Suspensões de bactérias a  $1 \times 10^7$  UFC/mL foram incubadas por 20 minutos a 180 rpm e 37 °C. Dados expressam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de UFC/mL em relação aos controles tratados com PBS para três experimentos independentes e três replicatas de cada amostra. \*\*\* $p < 0,0001$  em relação aos controles com PBS e ## $p < 0,001$  em relação aos controles isolados.

## **Discussão**

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que o potencial de interação de Gal-4 e Gal-3 com a região O-PS de *E. coli* O86 é um modelo promissor para desenvolvimento de estratégias antimicrobianas. Para tanto, demonstramos que a Gal-4 leva a uma rápida perda de viabilidade dessa bactéria, que provoca perda de viabilidade de membrana, depende apenas parcialmente dos mecanismos de indução de radical hidroxil, e independe da resistência a AMPs. Por sua vez, a Gal-3 em altas concentrações reduz a viabilidade de *E. coli* O86 de forma dependente da presença do O-PS e independente dos mecanismos de resistência a AMPs. Ainda, essas galectinas apresentam funções sinérgicas com outros agentes antimicrobianos como PmB e Cipro.

Nossos dados indicam que Gal-4 diminui rapidamente a viabilidade da suspensão de *E. coli* O86 já após o primeiro minuto de incubação, com um crescimento posterior após o 20º minuto, diferentemente de Amp e outros antibióticos bactericidas (Lobritz et al. 2015). No entanto, mesmo havendo esse aumento, os resultados relativos aos controles de cada tempo são semelhantes à faixa anteriormente observada pelos autores de > 0% e < 10% de viabilidade relativa após 2 horas de incubação com Gal-4 (Stowell et al. 2010) e para outros trabalhos que verificaram os efeitos bactericidas de galectinas (Sasaki et al. 2020; A. M. Park et al. 2016; Stowell et al. 2014).

Ainda, outros trabalhos já relataram a formação de grumos e presença de unidades viáveis de bactérias após tratamentos com galectinas (Sasaki et al. 2020; A. M. Park et al. 2016). Considerando nossos resultados de incubação de diferentes concentrações iniciais de *E. coli* O86 com uma alta concentração de Gal-4 (5 µM), acreditamos que essas unidades se tratam de bactérias resistentes à sua ação bactericida em uma mesma população, ao invés de uma possível depleção dessa lectina no meio por excesso de ligante ou mesmo por aglutinação das bactérias, fenômeno que as protegeria da ação bactericida da Gal-4. Nossos resultados com tratamentos em  $1 \times 10^5$  UFC/mL de concentração inicial de *E. coli* O86 corroboram com essa hipótese, já que se trata de uma densidade muito baixa de células que apresentou o mesmo percentual de unidades viáveis, em relação às concentrações iniciais de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  UFC/mL, após incubação com uma alta concentração de Gal-4. Ainda, foi sugerido que esse fenômeno não é resultado de uma mutação, já que há relatos de que um novo inóculo a partir de uma colônia sobrevivente é igualmente susceptível à ação de galectinas (A. M. Park et al. 2016). Dessa forma, é possível que a *E. coli* O86 apresente mecanismos para garantir uma composição heterogênea em uma mesma população, como já relatado para variantes de *N. gonorrhoeae* que

conseguem alterar a biossíntese do LOS, e suas respectivas glicoformas, mesmo na ausência de uma pressão seletiva (John et al. 2002; Schneider et al. 1988). Curiosamente, foi relatado ainda que certas bactérias apresentam propriedades de regulação estocástica de expressão gênica, permitindo que uma parcela da população expresse um fenótipo de resistência na ausência de pressão seletiva (Carey et al. 2018). Embora o único fator determinante até então conhecido para ação de galectinas em bactérias seja a presença do ligante, não se descarta, entretanto, que outro mecanismo ainda não descrito seja responsável por essa resistência observada para a ação de galectinas em bactérias. De toda forma, é importante notar que as bactérias podem ter desenvolvido essas propriedades como um mecanismo evolutivo de colonização de organismos que expressam galectinas bactericidas, já que, a partir dessa estratégia, se garante que uma parcela da população bacteriana permanece viável para propagação do genótipo às gerações subsequentes.

A Gal-4 promove a morte de *E. coli* O86 por meio da ligação lectínica na porção O-PS do LPS, já que esse efeito não é observado na mutante  $\Delta waaL$ , na presença do carboidrato inibidor lactose, ou em formas mutadas de Gal-4 que perderam seu reconhecimento do carboidrato (Stowell et al. 2010). Nossos resultados por AFM, que determinaram o impacto desta lectina na topografia de membrana de *E. coli* O86 com perda de integridade e formação de extrusões vesiculares, se assemelham ao fenótipo do efeito observado de AMPs e polimixinas na membrana de bactérias gram-negativas (Kalfa et al. 2001; Brogden 2005; Hollmann et al. 2018; Tran et al. 2018) e reproduzem a perda de integridade de membrana observada anteriormente, associada ao efeito bactericida de Gal-8 em *E. coli* O86 (Stowell et al. 2010).

Ainda, apesar de ambos os domínios de Gal-4 serem capazes de reconhecer a região O-PS nesta bactéria, a Gal-4C é suficiente para promoção de morte deste microrganismo (Stowell et al. 2010). Em nossas análises por DM no modelo de membrana de *E. coli* O86, a Gal-4C interage com a porção carboidrato do LPS, sem, entretanto, se inserir na membrana. A interação é mais favorável quando ocorre por meio das etapas sequenciais de interação com o CRD e o seguinte direcionamento da região hidrofóbica da proteína em direção à membrana, conforme verificado na simulação MD-2 da Figura 12. No entanto, a ausência de inserção pode ser em decorrência do tempo curto da análise realizada (100 ns), da necessidade da presença de outras moléculas nos arredores, como proteínas de membrana bacteriana não contempladas em nosso sistema, ou mesmo outras Gal-4/Gal-4C.

Por sua vez, as análises por SMD das energias envolvidas e da conformação da Gal-4C durante a inserção na membrana externa sugerem que, nesse processo, a conformação do domínio com a região hidrofóbica em direção à membrana se torna mais favorável. Ainda, nossas análises das propriedades de superfície da Gal-4C indicam que esse domínio apresenta anfifilicidade, propriedade presente em AMPs e necessária para a ação desses peptídeos na membrana externa bacteriana (Brogden 2005; Hollmann et al. 2018). Considerando a natureza anfifílica da Gal-4C, e que é necessária a ligação lectínica para a ocorrência da morte bacteriana (Stowell et al. 2010), é possível que a interação do CRD com o O-PS tenha uma função importante não apenas na adesão inicial da proteína com este carboidrato do LPS, mas também como forma de estabilizar a estrutura da Gal-4C durante a inserção na membrana, assim como outras regiões polares da proteína nos demais carboidratos do glicocálix bacteriano, e assim favorecer a interação da região hidrofóbica do domínio no componente lipídico de membrana. Vale notar que a interação e possível inserção de Gal-4C na membrana de *E. coli* O86 tem maior potencial de desestabilizar a membrana devido ao volume ocupado por uma proteína, quando em comparação ao tamanho e volume de AMPs (Brogden 2005). Por sua vez, a contribuição da ligação lectínica do domínio N-terminal da Gal-4, apesar de não ser necessária para a ocorrência de morte em *E. coli* O86 (Stowell et al. 2010), não pode ser descartada por potencialmente permitir ligações *cis*-homotípicas em demais moléculas de LPS (Marth e Grewal 2008), assim aumentando o grau de complexidade da interação e desestabilização da membrana.

Nessa linha, os achados de formação de extrusões vesiculares associados à ação bactericida de Gal-4 sugerem que essa proteína possa ainda induzir uma curvatura negativa na membrana, tal como AMPs (Schmidt e Wong 2013). Dessa forma, tanto por ligação na superfície do carboidrato como por meio de inserção na membrana, é possível que várias Gal-4 poderiam se agregar localmente sobre o glicocálix bacteriano, criando zonas de desestabilização no LPS, induzindo curvatura, e assim contribuindo conjuntamente para a perda de homeostase da membrana de forma análoga aos modelos de adesão e de inserção de AMPs (Brogden 2005; Schmidt e Wong 2013; Hollmann et al. 2018). Entretanto, outros possíveis efeitos que ocorreriam indiretamente como consequência dessa interação não podem ser desconsiderados, como interferência no tráfico de lipídeos e perda de assimetria da membrana externa (May e Grabowicz 2018).

Por outro lado, nossas investigações da possível interferência da produção de espécies reativas de oxigênio por meio da reação de Fenton intracelular sugerem que a Gal-4 depende



apenas parcialmente desse mecanismo à jusante, comum para muitas classes de antibióticos bactericidas (Kohanski et al. 2007; Lobritz et al. 2015). Dessa forma, é possível que o dano de membrana provocado pela Gal-4 culmine no escape de superóxido da cadeia fosforilativa, e a consequente produção de radical hidroxil (Kohanski et al. 2007), de forma semelhante ao que ocorre para a PmB (Imlay 2013; Z. Yu et al. 2015). Entretanto, a capacidade de inibição desses agentes para o efeito bactericida da Gal-4 foi consideravelmente inferior da observada para a Amp, sugerindo que, apesar de aparentemente ocorrer um fenômeno metabólico à jusante da interação na membrana, ele não é essencial na promoção de morte da bactéria.

Por sua vez, foi relatado que a Gal-3 também reconhece a porção O-PS da *E. coli* O86, porém sem provocar a morte desta bactéria (Stowell et al. 2010). Surpreendentemente, verificamos que uma alta concentração de Gal-3 (40  $\mu$ M) reduz a viabilidade de *E. coli* O86, e esse efeito é dependente da ligação no O-PS, já que não ocorreu em *E. coli* O86  $\Delta$ *waaL*, assim como é dependente da presença do resíduo N-terminal, já que Gal-3C não reduziu a viabilidade da bactéria selvagem. Considerando que em *E. coli* O86 só tinham sido testadas concentrações de até 5  $\mu$ M de Gal-3 (Stowell et al. 2010), e em nossos resultados concentrações desta lectina para até 20  $\mu$ M não reduziram a viabilidade da bactéria, nossas observações estão de acordo com o que foi descrito anteriormente. Ainda, vale notar que propriedades bactericidas de Gal-3 já foram relatadas em *H. pylori* (A. M. Park et al. 2016) e propriedades bacteriostáticas em *S. pneumoniae* (Farnworth et al. 2008), sugerindo que, dependendo da glicana presente no LPS e de outros fatores relacionados à espécie de bactéria, a ligação de Gal-3 no O-PS tem propriedades antibacterianas. Por outro lado, não é possível determinar por meio de nossos resultados se a perda de viabilidade verificada para Gal-3 em *E. coli* O86 deriva de um efeito bactericida ou bacteriostático. De toda forma, em nosso modelo de *E. coli* O86 adotamos a concentração de 40  $\mu$ M como uma referência das propriedades antibacterianas de Gal-3 para os experimentos subsequentes.

O mecanismo de ação de AMPs depende principalmente do reconhecimento da carga negativa dos fosfatos presentes no LPS, e da inserção no componente lipídico da membrana externa bacteriana (Rice e Wereszczynski 2018; Brogden 2005; Simpson e Trent 2019). Considerando as propriedades anfífilas da Gal-4C, e os efeitos decorrentes da interação de Gal-4 e Gal-3 no LPS bacteriano, nos questionamos se a ação destas lectinas dependeria dos mecanismos de resistência a AMPs, que são responsáveis em promover as principais alterações no LPS, garantindo a resistência das bactérias a agentes antimicrobianos. No entanto, nossos resultados demonstraram que os efeitos de Gal-4 e Gal-3 independem dos mecanismos de

resistência a AMPs. Para tanto, realizamos três abordagens diferentes como forma de resolver essa questão: *i*) inibição da interação com o fosfato por suplementação do meio com altas concentrações de  $Mg^{2+}$  (Newton 1953; C. C. Chen e Feingold 1972), *ii*) ativação e desativação dos sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B (García Vescovi, Soncini, e Groisman 1996; Wösten et al. 2000) e *iii*) transformação de *E. coli* O86 com plasmídeo contendo o gene *mcr-1* (Liu et al. 2016; 2017), sendo que em nenhuma das abordagens foi observada a resistência à ação de Gal-4 e Gal-3.

Nossos resultados se destacam por indicarem que a ligação das galectinas na região O-PS culmina em propriedades antibacterianas distintas do observado para os mecanismos de resistência a AMPs e polimixinas, mesmo considerando que interagem no mesmo alvo, o LPS (Hollmann et al. 2018; Z. Yu et al. 2015). Soma-se a isso a importância de que as propriedades antibacterianas de Gal-4 e Gal-3 independem da presença do gene *mcr-1*, que vem sendo alvo de preocupação da comunidade médica e científica nos últimos anos por conferir resistência a um último recurso terapêutico e, assim, preencher uma lacuna no repertório de mecanismos de ação antibacterianos contemplados em bactérias MDR (Liu et al. 2016; García-Meniño et al. 2019; Wu et al. 2021). Ainda, as diversas alterações promovidas pelos sistemas de dois componentes PhoP/Q e PmrA/B, que não se resumem apenas na transferência de grupos químicos aos fosfatos do LPS (Simpson e Trent 2019; Z. Yu et al. 2015), indicam que essas alterações não são suficientes para reduzir os efeitos promovidos por Gal-4 e Gal-3. Vale notar que, apesar de verificarmos, em nossas simulações por SMD, interações com o lipídeo A e o oligossacarídeo central do LPS por parte da Gal-4C, alterações nessas regiões aparentemente não são suficientes para evitar o efeito bactericida observado e sugerem, portanto, um mecanismo distinto para provocar lise da membrana bacteriana. Em nosso conhecimento, somos o primeiro grupo a demonstrar que as galectinas independem da presença ou ativação desses mecanismos de resistência. Dessa forma, apesar de dependerem da interação com a região O-PS, acreditamos que as galectinas detêm grande potencial para serem exploradas como modelo de desenvolvimento de novas estratégias antibacterianas na clínica.

Ainda nessa linha, verificamos que tanto Gal-4 como Gal-3 apresentam efeitos sinérgicos com PmB na promoção de morte de *E. coli* O86. Verificamos que a ligação específica ao O-PS é importante, já que não ocorreu junto às adições de Gal-1 na bactéria selvagem, e de Gal-4 e Gal-3 na bactéria mutante. Por outro lado, o Anti-B, que se liga com alta afinidade (Mishra e Mariuzza 2018) no antígeno do tipo B presente na região O-PS de *E. coli* O86 (Springer e Horton 1969; Stowell et al. 2010), também não foi capaz de potencializar os efeitos

de PmB nesta bactéria, indicando que a interação na glicana não é suficiente *per se*. Dessa forma, a diferença na interação das galectinas ao O-PS em comparação às verificadas para anticorpos, tanto pela natureza da afinidade de ligação, como pelas diferenças nas propriedades de oligomerização e estabilização de ligantes, favorecem esta classe de lectinas em detrimento aos anticorpos para a potencialização dos efeitos da PmB. Entretanto, até o momento não se sabe se essa interação potencializaria a ação de AMPs endógenos. Considerando a presença de ambas as classes de moléculas no contexto infeccioso e de inflamação (Farnworth et al. 2008; Cao e Guo 2016), sugerimos que galectinas possam atuar junto a esses peptídeos na promoção eliminação de patógenos específicos, trazendo maior complexidade às propriedades antibacterianas de galectinas e especificidade ao repertório de elementos microbicidas da imunidade inata. Se isso for verdade, as galectinas poderia tanto atuar na resolução de patógenos humanos, como também para o controle de infecções em animais invertebrados que dependem quase que exclusivamente de elementos da imunidade inata (Zhang et al. 2020; García-Maldonado, Cano-Sánchez, e Hernández-Santoyo 2017; Sreeramulu et al. 2018). Ainda, vale notar que muitos desses organismos apresentam um grande repertório de galectinas (Takeuchi 2018), ressaltando uma importância evolutiva desta família de lectinas nesse contexto.

Por sua vez, a forma truncada da Gal-3, a Gal-3C, não foi capaz de potencializar a ação da PmB. Considerando que a perda da região N-terminal dessa lectina compromete a oligomerização, que envolve as interações inter e intra moleculares de natureza difusa (Y. H. Lin et al. 2017), é possível que a capacidade de oligomerização das galectinas seja um evento importante para a potencialização do efeito da PmB. Além disso, foi relatado que, por meio da oligomerização, a Gal-3 forma complexos com separação de fase líquido : líquido com o LPS bacteriano (Chiu et al. 2020), resultando potencialmente na alteração do microambiente onde se situa a região carboidrato do LPS e, assim, favorecendo a interação e inserção da PmB. Entretanto, não sabemos se a capacidade da Gal-4 em realizar ligações bivalentes, por meio da ligação de ambos seus domínios no O-PS da *E. coli* O86, é também necessária para a promoção da potencialização observada em PmB nesta bactéria, assim como quantas interações de galectinas : O-PS culminam em um sinergismo com PmB, e se a capacidade de oligomerização das galectinas seria um fator determinante na promoção deste mecanismo microbicida. Dessa forma, mais estudos que respondam esses questionamentos se fazem necessários, considerando a variedade de interações já conhecidas de galectinas com o LPS de gram-negativas (Stowell et al. 2014; Knirel et al. 2014; Farnworth et al. 2008; A. M. Park et al. 2016; S K Gupta et al.

1997; Kavanaugh et al. 2013; Sasaki et al. 2020; Nita-Lazar et al. 2015; Quattroni et al. 2012; John et al. 2002).

Nossos resultados mostraram ainda que a interação por parte de Gal-4 e Gal-3 com a região O-PS é capaz de potencializar o efeito da PmB mesmo na presença de 20 mM de  $Mg^{2+}$ , da ativação do sistema de dois componentes PmrA/B, e na presença do gene *mcr-1*. No entanto, nesses casos só se observa a potencialização para as maiores concentrações subletais deste antibiótico, sugerindo assim que as concentrações subletais das galectinas atuam no favorecimento da interação da PmB no seu alvo LPS. Esses achados são importantes tanto para a formulação de hipóteses mecanísticas acerca desse fenômeno, como ressaltam a importância clínica do potencial antimicrobiano de galectinas por meio de suas interações com o O-PS. Foi relatado que os efeitos de promoção de morte de PmB dependem da entrada desse antibiótico no espaço periplasmático e inserção na membrana interna bacteriana (Velkov et al. 2013; 2010; Hollmann et al. 2018). Dessa forma, se a Gal-4 e a Gal-3 *per se* permeabilizassem a membrana e permitissem a entrada de PmB, nas condições de resistência a AMPs, essas lectinas potencializariam a concentração de 0,2  $\mu\text{g/mL}$  de PmB, o que não foi verificado. Ainda, não foi observado sinergismo de PmB (0,2  $\mu\text{g/mL}$ ) junto à concentração bactericida de Gal-4 (1  $\mu\text{M}$ ). Portanto, acreditamos que essas lectinas atuem conjuntamente com a PmB na membrana externa, facilitando a interação e inserção dessas moléculas por meio da ligação lectínica, ao invés de abrirem poros na membrana externa e permitirem a passagem de PmB ao espaço periplasmático. Sendo assim, a formação de domínios de ligação e potencial desestabilização do glicocálix bacteriano, por meio das interações de natureza multivalente da Gal-4 e de oligomerização da Gal-3, podem reduzir a concentração necessária desses antibióticos para atingir o limiar do efeito microbicida (Starr, He, e Wimley 2016).

Além disso, ao verificarmos que as concentrações de 0,2  $\mu\text{M}$  de Gal-4 e 1  $\mu\text{M}$  de Gal-3, que ocorrem *in vivo* (Cao e Guo 2016; Sato et al. 2002), são capazes de potencializar a ação da PmB, é possível que o até então subestimado papel de galectinas endógenas possa ter um influência relevante junto à terapia por polimixinas na clínica, mesmo em infecções de bactérias MDR e/ou que apresentem o gene *mcr-1*. É importante notar que tratamentos clínicos com PmB e colistina apresentam diversos efeitos tóxicos (Biswas et al. 2012; Z. Yu et al. 2015), sendo uma estratégia atual a busca de novas associações que potencializem a ação dessa classe de antibióticos como forma de diminuir o valor da dose terapêutica (Hollmann et al. 2018). No entanto, a investigação do impacto *in vivo* dessa associação se faz necessária.

Curiosamente, não apenas a Gal-4 e Gal-3 potencializam a ação da PmB, que se liga em um sítio distinto da mesma molécula, mas também a administração conjunta de concentrações subletais de ambas as galectinas revelou que estas apresentam um efeito sinérgico e dependente da ligação específica no O-PS, já que esse fenômeno não foi observado em associações de Gal-4 com Gal-1. Ainda, o sinergismo não ocorreu quando associada alguma concentração antibacteriana de Gal-3 (40  $\mu\text{M}$ ) e Gal-4 (1  $\mu\text{M}$ ), e a necessidade da forma inteira da Gal-3 para a ocorrência desse fenômeno também foi verificada, sugerindo que a oligomerização por parte desta lectina é importante. Sendo assim, é possível que, neste caso, a Gal-3 facilite a interação e inserção da Gal-4 na superfície da membrana externa bacteriana, de forma possivelmente semelhante ao que ambas fazem com PmB, para que a galectina *tandem repeat* por sua vez provoque seus efeitos bactericidas.

No caso de outros agentes antimicrobianos que não interagem com o LPS, verificamos que Gal-4 e Gal-3 não apresentaram sinergismo com o  $\beta$ -lactâmico Amp, mas a concentração bactericida de Gal-4 (0,8  $\mu\text{M}$ ) foi sinérgica com Cipro. Esses achados estão de acordo com o observado anteriormente na literatura, de que AMPs potencializam a ação dessa cefalosporina por permeabilizarem a membrana e facilitarem a entrada do antibiótico no citoplasma bacteriano, que atua inibindo as topoisomerases II e IV bacterianas (Hollmann et al. 2018). Dessa forma, é possível que os efeitos de indução da perda de integridade de membrana e de formação de extrusões vesiculares por parte de concentrações bactericidas da Gal-4 atuem em sinergismo com outros agentes antimicrobianos, cujos alvos se encontrem no citoplasma bacteriano, e são assim favorecidos pelo desmantelamento de membrana promovida por esta lectina (L. Lin et al. 2015; Nuding et al. 2014; Tran et al. 2018).

Sugerimos com base em nossos dados que os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 sobre a membrana externa bacteriana atuam de forma distinta a outros mecanismos de ação conhecidos. Nessa linha, essas galectinas agem independentemente da presença dos mecanismos de resistência a AMPs, que envolvem alterações no mesmo alvo molecular da interação, e tem capacidade de provocar morte mesmo em microrganismos que apresentam o gene *mcr-1*. Ainda, a capacidade da Gal-4 e Gal-3 em apresentarem sinergismo com outros agentes antimicrobianos tem relevância clínica, imunológica e biotecnológica. Sendo assim, acreditamos que a interação das galectinas com o O-PS de bactérias gram-negativas consiste em uma abordagem promissora para a formulação de novas estratégias antibacterianas.

## **Considerações finais**

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A Gal-4 promove uma rápida perda de viabilidade em *E. coli* O86 seguido de um crescimento bacteriano absoluto. Ainda, a cinética de perda de viabilidade é dependente da concentração bacteriana inicial embora a porcentagem mínima de unidades viáveis seja independente desta concentração;
- A Gal-4 induz perda de integridade de membrana e formação de extrusões vesiculares em *E. coli* O86;
- A Gal-3 em altas concentrações induz perda de viabilidade bacteriana de forma dependente da presença do O-PS de *E. coli* O86;
- A interação e inserção da Gal-4C no modelo de membrana de *E. coli* O86 são mais favoráveis por meio de seu CRD e do direcionamento da região hidrofóbica na membrana bacteriana, respectivamente;
- Os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3 são independentes dos mecanismos de resistência a AMPs;
- A ação bactericida da Gal-4 depende parcialmente do mecanismo de indução da reação de Fenton intracelular;
- Gal-4 e Gal-3 potencializam de forma carboidrato-dependente os efeitos bactericidas de PmB em *E. coli* O86, mesmo em ambientes de resistência a AMPs;
- Gal-4 e Gal-3 apresentam efeitos sinérgicos na redução de viabilidade de *E. coli* O86 de forma dependente da ligação específica no O-PS;
- A oligomerização da Gal-3 é essencial para seus efeitos antibacterianos;
- Concentração bactericida de Gal-4 apresenta efeitos sinérgicos com a cefalosporina Cipro.

## **Conclusão**



## **7. CONCLUSÃO**

Concluimos que os efeitos antibacterianos de Gal-4 e Gal-3, decorrentes das interações de seus CRDs com a porção O-PS do LPS de *E. coli* O86, são distintos dos mecanismos microbicidas de antibióticos e AMPs. Essas galectinas apresentam ainda efeitos sinérgicos com PmB e Cipro, sugerindo que a capacidade da interação na região O-PS por parte destas lectinas confere um potencial promissor para desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas.

## **Referências**

## 8. REFERÊNCIAS

Abraham, Mark James, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, e Erik Lindah. 2015. “Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers”. *SoftwareX* 1–2 (setembro): 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.

Ahmad, Nisar, Hans J. Gabius, Sabine André, Herbert Kaltner, Subramanian Sabesan, René Roy, Bingcan Liu, Frank Macaluso, e C. Fred Brewer. 2004. “Galectin-3 Precipitates as a Pentamer with Synthetic Multivalent Carbohydrates and Forms Heterogeneous Cross-linked Complexes”. *Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 10841–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312834200>.

Almkvist, J., J. Fäldt, C. Dahlgren, H. Leffler, e A. Karlsson. 2001. “Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe”. *Infection and Immunity* 69 (2): 832–37. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.832-837.2001>.

Almkvist, Jenny, e Anna Karlsson. 2002. “Galectins as inflammatory mediators”. *Glycoconjugate Journal*. Glycoconj J. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014088.21242.e0>.

Aminov, Rustam I. 2010. “A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future”. *Article* 1 (1). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>.

Andersson, Mats, Nils Carlin, Karin Leontein, Ulf Lindquist, e Kerstin Slettengren. 1989. “Structural studies of the O-antigenic polysaccharide of Escherichia coli O86, which possesses blood-group B activity”. *Carbohydrate Research* 185 (2): 211–23. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)80036-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)80036-9).

Arthur, Connie M., Richard D. Cummings, e Sean R. Stowell. 2015. “Evaluation of the Bactericidal Activity of Galectins”. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1207: 421. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1396-1\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1396-1_27).

Barbosa, H. R., M. F.A. Rodrigues, C. C. Campos, M. E. Chaves, I. Nunes, Y. Juliano, e N. F. Novo. 1995. “Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: A comparison between the drop and the spread methods”. *Journal of Microbiological Methods* 22 (1): 39–50. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(94\)00062-C](https://doi.org/10.1016/0167-7012(94)00062-C).

Barondes, Samuel H., Vincent Castronovo, Douglas N.W. Cooper, Richard D. Cummings, Kurt Drickamer, Ten Felzi, Michael A. Gitt, et al. 1994. “Galectins:

A family of animal  $\beta$ -galactoside-binding lectins”. *Cell* 76 (4): 597–98. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90498-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90498-7).

Bechinger, B., e S. U. Gorr. 2017. “Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance”. *Journal of Dental Research* 96 (3): 254–60. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>.

Belo, Ana I., Astrid M. van der Sar, Boris Tefsen, e Irma van Die. 2013. “Galectin-4 Reduces Migration and Metastasis Formation of Pancreatic Cancer Cells”. *PLoS ONE* 8 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065957>.

Berendsen, H. J.C., J. P.M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. Dinola, e J. R. Haak. 1984. “Molecular dynamics with coupling to an external bath”. *The Journal of Chemical Physics* 81 (8): 3684–90. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.

Berman, Helen M., John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov, e Philip E. Bourne. 2000. “The Protein Data Bank”. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.

Biswas, Silpak, Jean Michel Brunel, Jean Christophe Dubus, Martine Reynaud-Gaubert, e Jean Marc Rolain. 2012. “Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century”. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Expert Rev Anti Infect Ther. <https://doi.org/10.1586/eri.12.78>.

Blaauwen, Tanneke den, José M. Andreu, e Octavio Monasterio. 2014. “Bacterial cell division proteins as antibiotic targets”. *Bioorganic Chemistry* 55 (agosto): 27–38. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2014.03.007>.

Bodewits, Karin, Christian R.H. Raetz, John R. Govan, e Dominic J. Campopiano. 2010. “Antimicrobial activity of CHIR-090, an inhibitor of lipopolysaccharide biosynthesis, against the Burkholderia cepacia complex”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (8): 3531–33. <https://doi.org/10.1128/AAC.01600-09>.

Brachman, Philip S. 2003. “Infectious diseases—past, present, and future”. *International Journal of Epidemiology* 32 (5): 684–86. <https://doi.org/10.1093/ije/dyg282>.

Brogden, Kim A. 2005. “Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?” *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.

Cao, Zhan Qi, e Xiu Li Guo. 2016. “The role of galectin-4 in physiology and

diseases”. *Protein and Cell* 7 (5): 314–24. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0262-9>.

Carey, Jeffrey N., Erin L. Mettert, Manuela Roggiani, Kevin S. Myers, Patricia J. Kiley, e Mark Goulian. 2018. “Regulated Stochasticity in a Bacterial Signaling Network Permits Tolerance to a Rapid Environmental Change”. *Cell* 173 (1): 196–207.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.005>.

Chen, C. C., e D. S. Feingold. 1972. “Locus of divalent cation inhibition of the bactericidal action of polymyxin B.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2 (5): 331–35. <https://doi.org/10.1128/AAC.2.5.331>.

Chen, H. Deborah, e Eduardo A. Groisman. 2013. “The Biology of the PmrA/PmrB Two-Component System: The Major Regulator of Lipopolysaccharide Modifications”. *Annual Review of Microbiology* 67 (1): 83–112. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155751>.

Chiu, Yi Ping, Yung Chen Sun, De Chen Qiu, Yu Hao Lin, Yin Quan Chen, Jean Cheng Kuo, e Jie rong Huang. 2020. “Liquid-liquid phase separation and extracellular multivalent interactions in the tale of galectin-3”. *Nature Communications* 11 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15007-3>.

Christensen, David G., James S. Orr, Christopher V. Rao, e Alan J. Wolfe. 2017. “Increasing growth yield and decreasing acetylation in *Escherichia coli* by optimizing the carbon-to-magnesium ratio in peptide-based media”. *Applied and Environmental Microbiology* 83 (6): 3034–50. <https://doi.org/10.1128/AEM.03034-16>.

Chung, Andrew W., Peter A. Sieling, Mirjam Schenk, Rosane M.B. Teles, Stephan R. Krutzik, Daniel K. Hsu, Fu Tong Liu, et al. 2013. “Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes”. *Journal of Infectious Diseases* 207 (6): 947–56. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis920>.

Cockram, Tom O.J., Mar Puigdellívol, e Guy C. Brown. 2019. “Calreticulin and Galectin-3 Oponise Bacteria for Phagocytosis by Microglia”. *Frontiers in Immunology* 10 (novembro). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02647>.

Conde-Rodríguez, Ileana, Guadalupe Delgado-López, Erick Armenta-Castro, Ivonne Ramírez-Díaz, Maricruz Anaya-Ruiz, Claudia T. Gutiérrez-Quiroz, Juan Carlos Flores-Alonso, et al. 2020. “Evaluation of Serum Levels and Expression of Galectin-4 in Cervical Cancer”. *BioMed Research International* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6756723>.

Cuthbertson, Leslie, Veronica Kos, e Chris Whitfield. 2010. “ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates.” *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 74 (3): 341–62. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00009-10>.

Darden, Tom, Darrin York, e Lee Pedersen. 1993. “Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems”. *The Journal of Chemical Physics* 98 (12): 10089–92. <https://doi.org/10.1063/1.464397>.

Davis, Starkey D., Antoinette Iannetta, e Ralph J. Wedgwood. 1971. “Activity of colistin against pseudomonas aeruginosa: Inhibition by calcium”. *Journal of Infectious Diseases* 124 (6): 610–12. <https://doi.org/10.1093/infdis/124.6.610>.

Díaz-Alvarez, Laura, e Enrique Ortega. 2017. “The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens”. *Mediators of Inflammation*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/9247574>.

Doumith, Michel, Gauri Godbole, Philip Ashton, Lesley Larkin, Tim Dallman, Martin Day, Michaela Day, et al. 2016. “Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in human and food isolates of Salmonella enterica and Escherichia coli in England and Wales”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (8): 2300–2305. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw093>.

Dwyer, D. J., P. A. Belenky, J. H. Yang, I. C. MacDonald, J. D. Martell, N. Takahashi, C. T. Y. Chan, et al. 2014. “Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (20): E2100–2109. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401876111>.

Dwyer, Daniel J., Michael A. Kohanski, Boris Hayete, e James J. Collins. 2007. “Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in Escherichia coli”. *Molecular Systems Biology* 3 (91). <https://doi.org/10.1038/msb4100135>.

Erridge, Clett, Elliott Bennett-Guerrero, e Ian R. Poxton. 2002. “Structure and function of lipopolysaccharides”. *Microbes and Infection* 4 (8): 837–51. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01604-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01604-0).

Farnworth, Sarah L., Neil C. Henderson, Alison C. MacKinnon, Kirsten M. Atkinson, Tom Wilkinson, Kevin Dhaliwal, Katsutoshi Hayashi, et al. 2008. “Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function”. *American Journal of Pathology* 172 (2): 395–405.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070870>.

Feng, Lu, Weiqing Han, Quan Wang, David A. Bastin, e Lei Wang. 2005. “Characterization of *Escherichia coli* O86 O-antigen gene cluster and identification of O86-specific genes”. *Veterinary Microbiology* 106 (3–4): 241–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.021>.

Fermino, Marise Lopes, Claudia Danella Polli, Karina Alves Toledo, Fu-Tong Liu, Dan K. Hsu, Maria Cristina Roque-Barreira, Gabriela Pereira-da-Silva, Emerson Soares Bernardes, e Lise Halbwachs-Mecarelli. 2011. “LPS-Induced Galectin-3 Oligomerization Results in Enhancement of Neutrophil Activation”. Organizado por Jean-Pierre Gorvel. *PLoS ONE* 6 (10): e26004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026004>.

Ferraz, Luciana C., Emerson S. Bernardes, Aline F. Oliveira, Luciana P. Ruas, Marise L. Fermino, Sandro G. Soares, Adriano M. Loyola, et al. 2008. “Lack of galectin-3 alters the balance of innate immune cytokines and confers resistance to *Rhodococcus equi* infection”. *European Journal of Immunology* 38 (10): 2762–75. <https://doi.org/10.1002/eji.200737986>.

Fradin, Chantal, Daniel Poulain, e Thierry Jouault. 2000. “ $\beta$ -1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32- kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3”. *Infection and Immunity* 68 (8): 4391–98. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.8.4391-4398.2000>.

García-Maldonado, Efrén, Patricia Cano-Sánchez, e Alejandra Hernández-Santoyo. 2017. “Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus*”. *Fish and Shellfish Immunology* 66 (julho): 564–74. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.057>.

García-Meniño, Isidro, Dafne Díaz-Jiménez, Vanesa García, María de Toro, Saskia C. Flament-Simon, Jorge Blanco, e Azucena Mora. 2019. “Genomic Characterization of Prevalent *mcr-1*, *mcr-4*, and *mcr-5* *Escherichia coli* Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain”. *Frontiers in Microbiology* 10 (novembro). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02469>.

García Vescovi, Eleonora, Fernando C. Soncini, e Eduardo A. Groisman. 1996. “Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: Environmental regulation of *Salmonella* virulence”. *Cell* 84 (1): 165–74. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81003-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81003-X).

Gritsenko, V A, e O V Bukharin. [s.d.]. “[The ecological and medical aspects of the symbiosis between *Escherichia coli* and man].” *Zhurnal mikrobiologii*,

*epidemiologii, i immunobiologii*, n° 3: 92–99. Acessado 21 de abril de 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10925888>.

Gupta, S K, S Masinick, M Garrett, e L D Hazlett. 1997. “Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins.” *Infection and Immunity* 65 (7).

Gupta, Suresh K., Sharon Masinick, Michael Garrett, e Linda D. Hazlett. 1997. “Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins”. *Infection and Immunity* 65 (7): 2747–53. <https://doi.org/10.1128/iai.65.7.2747-2753.1997>.

Han, Weiqing, Baolin Wu, Lei Li, Guohui Zhao, Robert Woodward, Nicholas Pettit, Li Cai, Vireak Thon, e Peng G. Wang. 2012. “Defining function of lipopolysaccharide O-antigen ligase waal using chemoenzymatically synthesized substrates”. *Journal of Biological Chemistry* 287 (8): 5357–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.308486>.

Hancock, Robert E.W. 1997. “Peptide antibiotics”. *Lancet*. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80051-7).

Hayashi, Takuo, Tsuyoshi Saito, Tsutomu Fujimura, Kieko Hara, Kazuya Takamochi, Keiko Mitani, Reiko Mineki, et al. 2013. “Galectin-4, a novel predictor for lymph node metastasis in lung adenocarcinoma”. *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081883>.

Hebditch, Max, e Jim Warwicker. 2019. “Web-based display of protein surface and pH-dependent properties for assessing the developability of biotherapeutics”. *Scientific Reports* 9 (1): 1969. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36950-8>.

Herigstad, Becky, Martin Hamilton, e Joanna Heersink. 2001. “How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria”. *Journal of Microbiological Methods* 44 (2): 121–29. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4).

Hess, Berk, Henk Bekker, Herman J.C. Berendsen, e Johannes G.E.M. Fraaije. 1997. “LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations”. *Journal of Computational Chemistry* 18 (12): 1463–72. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H).

Hockney, R. W., S. P. Goel, e J. W. Eastwood. 1974. “Quiet high-resolution computer models of a plasma”. *Journal of Computational Physics* 14 (2): 148–58. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(74\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0021-9991(74)90010-2).



Hokama, Akira, Emiko Mizoguchi, Ken Sugimoto, Yasuyo Shimomura, Yosuke Tanaka, Masaru Yoshida, Svend T. Rietdijk, et al. 2004. "Induced reactivity of intestinal CD4+ T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation". *Immunity* 20 (6): 681–93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.009>.

Hollmann, A, M Martinez, P Maturana, L C Semorile, e P C Maffia. 2018. "Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes and Synergism With Chemical Antibiotics". *Front. Chem* 6: 204. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00204>.

Hsu, Yen-Pang, Edward Hall, Garrett Booher, Brennan Murphy, Atanas D. Radkov, Jacob Yablonowski, Caitlyn Mulcahey, et al. 2019. "Fluorogenic d-amino acids enable real-time monitoring of peptidoglycan biosynthesis and high-throughput transpeptidation assays". *Nature Chemistry* 11 (4): 335–41. <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0217-x>.

Huang, Jing, e Alexander D. Mackerell. 2013. "CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data". *Journal of Computational Chemistry* 34 (25): 2135–45. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.  
Huflejt, Margaret E., e Hakon Leffler. 2003. "Galectin-4 in normal tissues and cancer". *Glycoconjugate Journal*. Glycoconj J. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000025819.54723.a0>.

Hunt, Fern. 1985. "Patterns of LPS synthesis in Gram negative bacteria". *Journal of Theoretical Biology* 115 (2): 213–19. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(85\)80097-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(85)80097-7).

Imlay, James A. 2013. "The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium". *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>.

Inge, Lerouge, e Vanderleyden Jos. 2001. "O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions". *FEMS Microbiology Reviews* 26 (1): 17–47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x>.

Jo, Sunhwan, Taehoon Kim, Vidyashankara G. Iyer, e Wonpil Im. 2008. "CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM". *Journal of Computational Chemistry* 29 (11): 1859–65. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.

John, Constance M., Gary A. Jarvis, Karen V. Swanson, Hakon Leffler, Morris

D. Cooper, Margaret E. Huflejt, e J. McLeod Griffiss. 2002. “Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected”. *Cellular Microbiology* 4 (10): 649–62. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00219.x>.

Jorgensen, William L., Jayaraman Chandrasekhar, Jeffry D. Madura, Roger W. Impey, e Michael L. Klein. 1983. “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water”. *The Journal of Chemical Physics* 79 (2): 926–35. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.

Juan, Carlos, Gabriel Torrens, Isabel Maria Barceló, e Antonio Oliver. 2018. “Interplay between Peptidoglycan Biology and Virulence in Gram-Negative Pathogens.” *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 82 (4): e00033-18. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00033-18>.

Kadrofske, Mark M., Kyle P. Openo, e John L. Wang. 1998. “The human LGALS3 (galectin-3) gene: Determination of the gene structure and functional characterization of the promoter”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349 (1): 7–20. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0447>.

Kalfa, V. C., H. P. Jia, R. A. Kunkle, Jr McCray, B. F. Tack, e K. A. Brogden. 2001. “Congeners of SMAP29 kill ovine pathogens and induce ultrastructural damage in bacterial cells”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (11): 3256–61. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3256-3261.2001>.

Kavanaugh, Devon, Marian Kane, Lokesh Joshi, e Rita M. Hickey. 2013. “Detection of galectin-3 interaction with commensal bacteria”. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (11): 3507–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.03694-12>.

Keren, Iris, Yanxia Wu, Julio Inocencio, Lawrence R Mulcahy, e Kim Lewis. 2013. “Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species.” *Science (New York, N.Y.)* 339 (6124): 1213–16. <https://doi.org/10.1126/science.1232688>.

Khondker, Adree, Alexander K. Dhaliwal, Sokunthearath Saem, Ahmad Mahmood, Cécile Fradin, Jose Moran-Mirabal, e Maikel C. Rheinstädter. 2019. “Membrane charge and lipid packing determine polymyxin-induced membrane damage”. *Communications Biology* 2 (1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0297-6>.

Kleshchenko, Yuliya Y., Tapria N. Moody, Vyacheslav A. Furtak, Josiah Ochieng, Maria F. Lima, e Fernando Villalta. 2004. “Human galectin-3 promotes

Trypanosoma cruzi adhesion to human coronary artery smooth muscle cells”. *Infection and Immunity* 72 (11): 6717–21. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6717-6721.2004>.

Knirel, Yu A., H. J. Gabius, O. Blixt, E. M. Rapoport, N. R. Khasbiullina, N. V. Shilova, e N. V. Bovin. 2014. “Human tandem-repeat-type galectins bind bacterial non- $\beta$ Gal polysaccharides”. *Glycoconjugate Journal* 31 (1): 7–12. <https://doi.org/10.1007/s10719-013-9497-3>.

Kohanski, Michael A., Daniel J. Dwyer, Boris Hayete, Carolyn A. Lawrence, e James J. Collins. 2007. “A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics”. *Cell* 130 (5): 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>.

Kohanski, Michael A., Daniel J. Dwyer, Jamey Wierzbowski, Guillaume Cottarel, e James J. Collins. 2008. “Mistranslation of Membrane Proteins and Two-Component System Activation Trigger Antibiotic-Mediated Cell Death”. *Cell* 135 (4): 679–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.038>.

Kohanski, Michael A, Daniel J Dwyer, e James J Collins. 2010. “How antibiotics kill bacteria: from targets to networks.” *Nature reviews. Microbiology* 8 (6): 423–35. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>.

Kohatsu, Luciana, Daniel K. Hsu, Armin G. Jegalian, Fu-Tong Liu, e Linda G. Baum. 2006. “ Galectin-3 Induces Death of Candida Species Expressing Specific  $\beta$ -1,2-Linked Mannans ”. *The Journal of Immunology* 177 (7): 4718–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4718>.

Kox, Linda F.F., Marc M.S.M. Wösten, e Eduardo A. Groisman. 2000. “A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system”. *The EMBO Journal* 19 (8): 1861. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.8.1861>.

Kuwabara, I, e F T Liu. 1996. “Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin.” *The Journal of Immunology* 156 (10).

Laskowski, R A, M W MacArthur, D S Moss, e J M Thornton. 1993. “PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures”. *Journal of Applied Crystallography* 26 (2): 283–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>.

Lee, Jumin, Dhilon S. Patel, Jonas Stähle, Sang Jun Park, Nathan R. Kern, Seonghoon Kim, Joonseong Lee, et al. 2019. “CHARMM-GUI Membrane

Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans”. *Journal of Chemical Theory and Computation* 15 (1): 775–86. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01066>.

Leffler, Hakon, Susanne Carlsson, Maria Hedlund, Yuning Qian, e Françoise Poirier. 2002. “Introduction to galectins”. *Glycoconjugate Journal*. Glycoconj J. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014072.34840.04>.

Lella, Santiago Di, Victoria Sundblad, Juan P. Cerliani, Carlos M. Guardia, Dario A. Estrin, Gerardo R. Vasta, e Gabriel A. Rabinovich. 2011. “When galectins recognize glycans: From biochemistry to physiology and back again”. *Biochemistry* 50 (37): 7842–57. <https://doi.org/10.1021/bi201121m>.

Lepur, Adriana, Emma Salomonsson, Ulf J. Nilsson, e Hakon Leffler. 2012. “Ligand induced galectin-3 protein self-association”. *Journal of Biological Chemistry* 287 (26): 21751–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.358002>.

Li, Yubin, Mousa Komai-Koma, Derek S. Gilchrist, Daniel K. Hsu, Fu-Tong Liu, Tabitha Springall, e Damo Xu. 2008. “Galectin-3 Is a Negative Regulator of Lipopolysaccharide-Mediated Inflammation”. *The Journal of Immunology* 181 (4): 2781–89. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2781>.

Lin, Leo, Poochit Nonejuie, Jason Munguia, Andrew Hollands, Joshua Olson, Quang Dam, Monika Kumaraswamy, et al. 2015. “Azithromycin Synergizes with Cationic Antimicrobial Peptides to Exert Bactericidal and Therapeutic Activity Against Highly Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Pathogens”. *EBioMedicine* 2 (7): 690–98. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.05.021>.

Lin, Yu Hao, De Chen Qiu, Wen Han Chang, Yi Qi Yeh, U. Ser Jeng, Fu Tong Liu, e Jie rong Huang. 2017. “The intrinsically disordered N-terminal domain of galectin-3 dynamically mediates multisite self-association of the protein through fuzzy interactions”. *Journal of Biological Chemistry* 292 (43): 17845–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802793>.

Liu, Yi Yun, Courtney E. Chandler, Lisa M. Leung, Christi L. McElheny, Roberta T. Mettus, Robert M.Q. Shanks, Jian Hua Liu, David R. Goodlett, Robert K. Ernst, e Yohei Doi. 2017. “Structural modification of lipopolysaccharide conferred by mcr-1 in gram-negative ESKAPE pathogens”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (6). <https://doi.org/10.1128/AAC.00580-17>.

Liu, Yi Yun, Yang Wang, Timothy R. Walsh, Ling Xian Yi, Rong Zhang, James Spencer, Yohei Doi, et al. 2016. “Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A

microbiological and molecular biological study”. *The Lancet Infectious Diseases* 16 (2): 161–68. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).

Lobritz, Michael A., Peter Belenky, Caroline B. M. Porter, Arnaud Gutierrez, Jason H. Yang, Eric G. Schwarz, Daniel J. Dwyer, Ahmad S. Khalil, e James J. Collins. 2015. “Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (27): 8173–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509743112>.

Loker, Eric S, Coen M. Adema, Si-Ming Zhang, e Thomas B. Kepler. 2004. “Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood”. *Immunological Reviews* 198 (1): 10–24. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>.

Lujan, Agustin L., Diego O. Croci, Julián A. Gambarte Tudela, Antonella D. Losinno, Alejandro J. Cagnoni, Karina V. Mariño, María T. Damiani, e Gabriel A. Rabinovich. 2018. “Glycosylation-dependent galectin–receptor interactions promote *Chlamydia trachomatis* infection”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (26): E6000–6009. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802188115>.

MacKinnon, Alison C., Sarah L. Farnworth, Philip S. Hodgkinson, Neil C. Henderson, Kirsten M. Atkinson, Hakon Leffler, Ulf J. Nilsson, Christopher Haslett, Stuart J. Forbes, e Tariq Sethi. 2008. “Regulation of Alternative Macrophage Activation by Galectin-3”. *The Journal of Immunology* 180 (4): 2650–58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2650>.

Maldonado, Rita F., Isabel Sá-Correia, e Miguel A. Valvano. 2016. “Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection”. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (4): 480–93. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>.

Marth, Jamey D., e Prabhjit K. Grewal. 2008. “Mammalian glycosylation in immunity”. *Nature Reviews Immunology* 8 (11): 874–87. <https://doi.org/10.1038/nri2417>.

May, Kerrie L., e Marcin Grabowicz. 2018. “The bacterial outer membrane is an evolving antibiotic barrier”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812779115>.

Mercier, Simon, Christian St-Pierre, Isabelle Pelletier, Michel Ouellet, Michel J. Tremblay, e Sachiko Sato. 2008. “Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in

macrophages through stabilization of viral adsorption”. *Virology* 371 (1): 121–29. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.09.034>.

Miles, A A, S S Misra, e J O Irwin. 1938. “The estimation of the bactericidal power of the blood.” *The Journal of hygiene* 38 (6): 732–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20475467>.

Mishra, Arjun K., e Roy A. Mariuzza. 2018. “Insights into the structural basis of antibody affinity maturation from next-generation sequencing”. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00117>.

Miyamoto, Shuichi, e Peter A. Kollman. 1992. “Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models”. *Journal of Computational Chemistry* 13 (8): 952–62. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>.

Moon, Dong Chan, Abraham Fikru Mechesso, Hee Young Kang, Su Jeong Kim, Ji Hyun Choi, Mi Hyun Kim, Hyun Ju Song, Soon Seek Yoon, e Suk Kyung Lim. 2020. “First report of an escherichia coli strain carrying the colistin resistance determinant mcr-1 from a dog in south korea”. *Antibiotics* 9 (11): 1–7. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110768>.

Munita, Jose M, e Cesar A Arias. [s.d.]. “Mechanisms of Antibiotic Resistance”. Acessado 19 de abril de 2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

Neidhardt, Frederick C., Philip L. Bloch, e David F. Smith. 1974. “Culture Medium for Enterobacteria”. *Journal of Bacteriology* 119 (3).

Newton, B. A. 1953. “Reversal of the antibacterial activity of polymyxin by divalent cations [2]”. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/172160a0>.

Nio-Kobayashi, Junko, Lyndsey Boswell, Maho Amano, Toshihiko Iwanaga, e W. Colin Duncan. 2014. “The loss of luteal progesterone production in women is associated with a galectin switch via  $\alpha$ 2,6-sialylation of glycoconjugates”. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99 (12): 4616–24. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2716>.

Nishi, Yumiko, Hideki Sano, Tatsuo Kawashima, Tomoaki Okada, Toshihisa Kuroda, Kyoko Kikkawa, Sayaka Kawashima, et al. 2007. “Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis”. *Allergology International* 56 (1): 57–65. <https://doi.org/10.2332/allergolint.O-06-449>.

Nita-Lazar, Mihai, Aditi Banerjee, Chiguang Feng, Mohammed N. Amin,

Matthew B. Frieman, Wilbur H. Chen, Alan S. Cross, Lai Xi Wang, e Gerardo R. Vasta. 2015. “Desialylation of airway epithelial cells during influenza virus infection enhances pneumococcal adhesion via galectin binding”. *Molecular Immunology* 65 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.12.010>.

Nuding, Sabine, Tina Frasc, Martin Schaller, Eduard F. Stange, e Lutz T. Zabel. 2014. “Synergistic effects of antimicrobial peptides and antibiotics against clostridium difficile”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (10): 5719–25. <https://doi.org/10.1128/AAC.02542-14>.

Orskov, I, e F Orskov. 1977. “Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic E. coli strains from diarrhea in adults and children. Occurrence of the CF (colonization factor) antigen and of hemagglutinating abilities.” *Medical microbiology and immunology* 163 (2): 99–110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/331065>.

Ouellet, Michel, Simon Mercier, Isabelle Pelletier, Salim Bounou, Jocelyn Roy, Jun Hirabayashi, Sachiko Sato, e Michel J Tremblay. 2005. “Galectin-1 Acts as a Soluble Host Factor That Promotes HIV-1 Infectivity through Stabilization of Virus Attachment to Host Cells 1”. *The Journal of Immunology*. Vol. 174.

Paclik, Daniela, Silvio Danese, Uta Berndt, Bertram Wiedenmann, Axel Dignass, e Andreas Sturm. 2008. “Galectin-4 Controls Intestinal Inflammation by Selective Regulation of Peripheral and Mucosal T Cell Apoptosis and Cell Cycle”. Organizado por Nina Papavasiliou. *PLoS ONE* 3 (7): e2629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002629>.

Park, Ah Mee, Satoru Hagiwara, Daniel K. Hsu, Fu Tong Liu, e Osamu Yoshie. 2016. “Galectin-3 plays an important role in innate immunity to gastric infection by *Helicobacter pylori*”. *Infection and Immunity* 84 (4): 1184–93. <https://doi.org/10.1128/IAI.01299-15>.

Park, Chan Bae, Hun Sik Kim, e Sun Chang Kim. 1998. “Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244 (1): 253–57. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159>.

Patel, Shilpa M., e Louis D. Saravolatz. 2006. “Monotherapy Versus Combination Therapy”. *Medical Clinics of North America*. Med Clin North Am. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2006.07.008>.

Pelletier, Isabelle, e Sachiko Sato. 2002. “Specific recognition and cleavage of

galectin-3 by *Leishmania major* through species-specific polygalactose epitope”. *Journal of Biological Chemistry* 277 (20): 17663–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201562200>.

Poirel, Laurent, Aurélie Jayol, e Patrice Nordmanna. 2017. “Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes”. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.

Powers, Jon Paul S., e Robert E.W. Hancock. 2003. “The relationship between peptide structure and antibacterial activity”. *Peptides* 24 (11): 1681–91. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.08.023>.

Prost, Lynne R., e Samuel I. Miller. 2008. “The Salmonellae PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals”. *Cellular Microbiology* 10 (3): 576–82. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2007.01111.X>.

Quattroni, Paola, Yanwen Li, Davide Lucchesi, Sebastian Lucas, Derek W. Hood, Martin Herrmann, Hans Joachim Gabius, Christoph M. Tang, e Rachel M. Exley. 2012. “Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic cells”. *Cellular Microbiology* 14 (11): 1657–75. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01838.x>.

Rabinovich, Gabriel A., e Marta A. Toscano. 2009. “Turning ‘sweet’ on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation”. *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*. <https://doi.org/10.1038/nri2536>.

Raz, Avraham, Pnina Carmi, Tirza Raz, Victor Hogan, Anwar Mohamed, e Sandra R. Wolman. 1991. “Molecular Cloning and Chromosomal Mapping of a Human Galactoside-binding Protein”. *Cancer Research* 51 (8).

Rice, Amy, e Jeff Wereszczynski. 2018. “Atomistic Scale Effects of Lipopolysaccharide Modifications on Bacterial Outer Membrane Defenses”. *Biophysj* 114: 1389–99. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.006>.

Rubin, Erica J., Carmen M. Herrera, Alexander A. Crofts, e M. Stephen Trent. 2015. “PmrD is required for modifications to *Escherichia coli* endotoxin that promote antimicrobial resistance”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (4): 2051–61. <https://doi.org/10.1128/AAC.05052-14>.

Rustiguel, Joane K, Ricardo O S Soares, Steve P Meisburger, Katherine M Davis, Kristina L Malzbender, Nozomi Ando, Marcelo Dias-Baruffi, e Maria Cristina Nonato. 2016. “Full-length model of the human galectin-4 and insights into



dynamics of inter-domain communication.” *Scientific reports* 6: 33633. <https://doi.org/10.1038/srep33633>.

Sakoulas, George, Arnold S. Bayer, Joseph Pogliano, Brian T. Tsuji, Soo Jin Yang, Nagendra N. Mishra, Victor Nizet, Michael R. Yeaman, e Pamela A. Moise. 2012. “Ampicillin enhances daptomycin- and cationic host defense peptide-mediated killing of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (2): 838–44. <https://doi.org/10.1128/AAC.05551-11>.

Šali, Andrej, e Tom L. Blundell. 1993. “Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints”. *Journal of Molecular Biology* 234 (3): 779–815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>.

Sambrook, Joseph, e David W. Russell. 2006. “ Transformation of *E. coli* by Electroporation ”. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006 (1): pdb.prot3933. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3933>.

Sasaki, Takaharu, Rei Saito, Midori Oyama, Tomoharu Takeuchi, Toru Tanaka, Hideshi Natsume, Mayumi Tamura, Yoichiro Arata, e Tomomi Hatanaka. 2020. “Galectin-2 has bactericidal effects against helicobacter pylori in a  $\beta$ -galactoside-dependent manner”. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082697>.

Sato, Sachiko, e Julie Nieminen. 2002. “Seeing strangers or announcing ‘danger’: Galectin-3 in two models of innate immunity”. *Glycoconjugate Journal* 19 (7–9): 583–91. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014089.17121.cc>.

Sato, Sachiko, Nathalie Ouellet, Isabelle Pelletier, Marie Simard, Ann Rancourt, e Michel G. Bergeron. 2002. “Role of Galectin-3 as an Adhesion Molecule for Neutrophil Extravasation During Streptococcal Pneumonia”. *The Journal of Immunology* 168 (4): 1813–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1813>.

Schmidt, Nathan W., e Gerard C.L. Wong. 2013. “Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: Geometry, coordination chemistry, and molecular engineering”. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2013.09.004>.

Schneider,’, Herman, Craig A Hammack, Michael A Apicella, J Mcleod, J M Griffiss, H Schneider, R E Mandrell, et al. 1988. “Instability of Expression of Lipooligosaccharides and Their Epitopes in *Neisseria gonorrhoeae*”. *INFECTION AND IMMUNITY*. Vol. 56.

Schrodinger, L L C. 2010. “The PyMOL molecular graphics system”. *Version 1* (5): 0.

Shen, Min-yi, e Andrej Sali. 2006. “Statistical potential for assessment and prediction of protein structures”. *Protein Science* 15 (11): 2507–24. <https://doi.org/10.1110/ps.062416606>.

Simpson, Brent W., e M. Stephen Trent. 2019. “Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences”. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>.

Sohlenkamp, Christian, e Otto Geiger. 2015. “Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways”. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>.

Springer, G. F., e R. E. Horton. 1969. “Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria.” *The Journal of clinical investigation* 48 (7): 1280–91. <https://doi.org/10.1172/JCI106094>.

SPRINGER, G F, R E HORTON, e M FORBES. 1959. “[Origin of anti-human blood group B agglutinins in white Leghorn chicks].” *The Journal of experimental medicine* 110 (2): 221–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13673136>.

Sreeramulu, Bhuvanaragavan, Ganesh Arumugam, Ramaraj Paulchamy, Hilda Karuppiah, e Janarthanan Sundaram. 2018. “ $\beta$ -Galactoside binding lectin from caddisfly larvae, *Stenopsyche kodaikanalensis* with selective modes of antibacterial activity: Purification and characterization”. *International Journal of Biological Macromolecules* 115 (agosto): 1033–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.158>.

Starr, Charles G., Jing He, e William C. Wimley. 2016. “Host Cell Interactions Are a Significant Barrier to the Clinical Utility of Peptide Antibiotics”. *ACS Chemical Biology* 11 (12): 3391–99. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00843>.

Stern, Alexandra Minna, e Howard Markel. 2005. “The History Of Vaccines And Immunization: Familiar Patterns, New Challenges”. *Health Affairs* 24 (3): 611–21. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.24.3.611>.

Stowell, Sean R., Connie M. Arthur, Ryan McBride, Oren Berger, Nahid Razi, Jamie Heimburg-Molinaro, Lilian C. Rodrigues, et al. 2014. “Microbial glycan microarrays define key features of host-microbial interactions”. *Nature Chemical Biology* 10 (6): 470–76. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1525>.

Stowell, Sean R., Yuning Qian, Sougata Karmakar, Natalia S. Koyama, Marcelo Dias-Baruffi, Hakon Leffler, Rodger P. McEver, e Richard D. Cummings. 2008. “Differential Roles of Galectin-1 and Galectin-3 in Regulating Leukocyte Viability and Cytokine Secretion”. *The Journal of Immunology* 180 (5): 3091–3102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3091>.

Stowell, Sean R, Connie M Arthur, Marcelo Dias-Baruffi, Lilian C Rodrigues, Jean-Philippe Gourdine, Jamie Heimburg-Molinaro, Tongzhong Ju, et al. 2010. “Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen”. *Nature Medicine* 16 (3): 295–301. <https://doi.org/10.1038/nm.2103>.

Stowell, Sean R, Richard D Cummings, e John M Walker. [s.d.]. *Galectins Series Editor*.

Subbalakshmi, Chilukuri, e Narasimhaiah Sitaram. 1998. “Mechanism of antimicrobial action of indolicidin”. *FEMS Microbiology Letters* 160 (1): 91–96. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00008-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00008-1).

Subhash, Vinod Vijay, e Bow Ho. 2016. “Galectin 3 acts as an enhancer of survival responses in *H. pylori*-infected gastric cancer cells”. *Cell Biology and Toxicology* 32 (1): 23–35. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9315-3>.

Subhash, Vinod Vijay, Samantha Shi Min Ling, e Bow Ho. 2016. “Extracellular galectin-3 counteracts adhesion and exhibits chemoattraction in *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer cells”. *Microbiology (United Kingdom)* 162 (8): 1360–66. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000322>.

Takeuchi, Tomoharu. 2018. “Galectins in Invertebrates with a focus on *Caenorhabditis elegans*”; *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 30 (172): SE67–74. <https://doi.org/10.4052/tigg.1735.1SE>.

Thai, Nguyen Quoc, Panagiotis E. Theodorakis, e Mai Suan Li. 2020. “Fast Estimation of the Blood-Brain Barrier Permeability by Pulling a Ligand through a Lipid Membrane”. *Journal of Chemical Information and Modeling* 60 (6): 3057–67. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00834>.

Toledo, Karina Alves, Marise Lopes Fermino, Camillo del Cistia Andrade, Thalita Bachelli Riul, Renata Tomé Alves, Vanessa Danielle Menjon Muller, Raquel Rinaldi Russo, et al. 2014. “Galectin-1 Exerts Inhibitory Effects during DENV-1 Infection”. Organizado por Tian Wang. *PLoS ONE* 9 (11): e112474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112474>.

Tran, Thien B., Jiping Wang, Yohei Doi, Tony Velkov, Phillip J. Bergen, e Jian

Li. 2018. “Novel Polymyxin Combination With Antineoplastic Mitotane Improved the Bacterial Killing Against Polymyxin-Resistant Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens”. *Frontiers in Microbiology* 9 (APR): 721. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00721>.

Varki, Ajit, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, e Marilyn E Etzler. 2009. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301239>.

Vasta, Gerardo R. 2009. “Roles of galectins in infection”. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2146>.

Vasta, Gerardo R., Chiguang Feng, Nuria González-Montalbán, Justin Mancini, Lishi Yang, Kelsey Abernathy, Graeme Frost, e Cheyenne Palm. 2017. “Functions of galectins as ‘self/non-self’-recognition and effector factors”. *Pathogens and Disease*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx046>.

Velkov, Tony, Kade D. Roberts, Roger L. Nation, Philip E. Thompson, e Jian Li. 2013. “Pharmacology of polymyxins: New insights into an ‘old class of antibiotics’”. *Future Microbiology* 8 (6): 711–24. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>.

Velkov, Tony, Philip E. Thompson, Roger L. Nation, e Jian Li. 2010. “Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics”. *Journal of Medicinal Chemistry*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jm900999h>.

Walsh, Christopher, e Timothy Wencewicz. 2015. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities, 2nd Edition*. <https://doi.org/10.1128/9781555819316>.

Webb, Benjamin, e Andrej Sali. 2016. “Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER”. *Current Protocols in Bioinformatics* 54 (1): 5.6.1-5.6.37. <https://doi.org/doi:10.1002/cpbi.3>.

Whitfield, Chris, e M. Stephen Trent. 2014. “Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides”. *Annual Review of Biochemistry* 83 (1): 99–128. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035600>.

“WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014”. 2016. WHO.

Wickham, Hadley. 2016. "Introduction". In , 3–10. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_1).

Wösten, Marc M.S.M., Linda F.F. Kox, Sangpen Chamnongpol, Fernando C. Soncini, e Eduardo A. Groisman. 2000. "A signal transduction system that responds to extracellular iron". *Cell* 103 (1): 113–25. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00092-1).

Wright, G. D. 2007. "BIOCHEMISTRY: A New Target for Antibiotic Development". *Science* 315 (5817): 1373–74. <https://doi.org/10.1126/science.1140374>.

Wu, Beibei, Yao Wang, Zhuoren Ling, Zhuoling Yu, Zhangqi Shen, Suxia Zhang, e Xiaoming Wang. 2021. "Heterogeneity and diversity of mcr-8 genetic context in chicken-associated klebsiella pneumoniae". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65 (1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01872-20>.

Yan, Xin Jiang, Guo Feng Yu, Yuan Qing Jie, Xiao Feng Fan, Qiang Huang, e Wei Min Dai. 2016. "Role of galectin-3 in plasma as a predictive biomarker of outcome after acute intracerebral hemorrhage". *Journal of the Neurological Sciences* 368 (setembro): 121–27. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.06.071>.

Yang, Ri Yao, Gabriel A. Rabinovich, e Fu Tong Liu. 2008. "Galectins: Structure, function and therapeutic potential". *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10 (17). <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>.

Yi, Wen, Jun Shao, Lizhi Zhu, Mei Li, Mamata Singh, Yuquan Lu, Steven Lin, et al. 2005. "Escherichia coli O86 O-antigen biosynthetic gene cluster and stepwise enzymatic synthesis of human blood group B antigen tetrasaccharide". *Journal of the American Chemical Society* 127 (7): 2040–41. <https://doi.org/10.1021/ja045021y>.

Yu, Xin, Hongru Zhang, Linyan Yu, Meifang Liu, Zengyan Zuo, Qiuju Han, Jian Zhang, Zhigang Tian, e Cai Zhang. 2018. "Intestinal lamina propria CD4 + T cells promote bactericidal activity of macrophages via galectin-9 and Tim-3 interaction during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection". *Infection and Immunity* 86 (8). <https://doi.org/10.1128/IAI.00769-17>.

Yu, Zhiliang, Wangrong Qin, Jianxun Lin, Shisong Fang, e Juanping Qiu. 2015. "Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance". *BioMed Research International*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/679109>.  
Yuko, Oda, Leffler Hakon, Sakakura Yasuhiko, Kasai Ken-ichi, e Samuel H. Barondes. 1991. "Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding

lectin homologous to mouse Mac-2 antigen”. *Gene* 99 (2): 279–83.  
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90139-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90139-3).

Zhang, Chi, Zhuang Xue, Zichao Yu, Hui Wang, Yu Liu, Huan Li, Lingling Wang, Chenghua Li, e Linsheng Song. 2020. “A tandem-repeat galectin-1 from *Apostichopus japonicus* with broad PAMP recognition pattern and antibacterial activity”. *Fish and Shellfish Immunology* 99 (abril): 167–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.011>.

**Apêndice:**

## APÊNDICE

### Soluções

- PBS  
8,00 g de NaCl;  
0,20 g de KCl;  
0,61 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;  
0,19 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
1 L de água deionizada;  
pH ajustado para 7,35;  
Esterilização por autoclave a 121 °C por 20 minutos.
- Solução estoque de PBS lactose 100 mM  
1,44 g de α-lactose;  
40 mL de PBS;  
Esterilização por filtração (0,22 μm).
- Solução estoque de PBS sacarose 100 mM  
1,44 g de sacarose;  
40 mL de PBS;  
Esterilização por filtração (0,22 μm).
- Solução de PBS com 14 mM de β-mercaptoetanol  
246 μL de β-mercaptoetanol 99%;  
250 mL de PBS.
- Solução de eluição de coluna de cromatografia de afinidade por lactose  
3,60 g de α-lactose;  
100 mL de Solução de PBS com 14 mM de β-mercaptoetanol.
- Tampão de amostra SDS-PAGE  
125 mM de Tris- HCl;  
200 mM de NaCl;  
4% de SDS;



- 0,004% de azul de bromofenol;  
10% de Glicerol;  
0,9% de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Solução de coloração azul brilhante de proteínas em gel SDS-PAGE  
0,02% Coomassie Brilliant Blue G 250;  
25 mL de água deionizada;  
25 mL de metanol.
  - Solução de 100 mM de  $\text{FeSO}_4$   
0,76 g de  $\text{FeSO}_4$ ;  
50 mL de água deionizada;  
Esterilização por autoclave a 121 °C por 20 minutos.
  - Solução de 2-2'-bipiridina (40 mM)  
31 mg de 2-2'-bipiridina;  
5 mL PBS;  
Esterilização por filtração (0,22  $\mu\text{m}$ ).
  - Solução de tioureia (1 M)  
76 mg de tioureia (Sigma);  
1 mL PBS;  
Esterilização por filtração (0,22  $\mu\text{m}$ ).
  - Glicerol 10%  
900 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ;  
Esterilização por autoclave a 121 °C por 20 minutos;  
Adição de 100 mL de glicerol 100% (Labsynth).
  - Paraformaldeído 2,5%  
2,5 g de paraformaldeído;  
100 mL de PBS;  
Esterilização por filtração (0,22  $\mu\text{m}$ ).

## Meios de cultura

- Meio LB (Luria Bertani)  
10 g de peptona;  
10 g de NaCl;  
5 g de extrato de levedura;  
1 L de água deionizada;  
Esterilização por autoclave a 121 °C por 20 minutos.
- Meio MH (Mueller Hinton) ágar  
36 g de meio MH (Kasvi);  
1 L de água deionizada;  
Esterilização por autoclave a 121 °C por 20 minutos.
- Meio LB suplementado com 22 mM de MgCl<sub>2</sub>  
200 mL da preparação de Meio LB não esterilizado;  
0,42 g de MgCl<sub>2</sub>;  
Esterilização por autoclave a 121 °C por 20 minutos.
- Meio LB suplementado com 400 µM de FeSO<sub>4</sub>  
100 mL de Meio LB;  
400 µL de Solução de 100 mM de FeSO<sub>4</sub>.
- Meio LB ágar  
40 g de meio LB Ágar (Kasvi);  
1 L de água deionizada;  
Esterilização por autoclave a 121 °C por 20 minutos.
- Meio LB Ágar suplementado com 50 µg/mL de gentamicina  
200 mL de meio LB Ágar aquecido a 55 °C  
200 µL de solução de gentamicina 50 mg/mL (Gibco).

## **Antibióticos**

As seguintes soluções foram esterilizadas por filtração a 0,22  $\mu\text{m}$  e mantidas em ambiente refrigerado (-20 °C ou 4 °C) até o momento de uso, conforme orientação dos respectivos fabricantes.

- Canamicina (25 mg/mL)  
0,25g de Canamicina;  
10 mL de água deionizada.
- Cloranfenicol (50 mg/mL)  
0,50 g de cloranfenicol;  
10 mL de etanol 99%.
- Ampicilina (50 mg/mL)  
0,50 g de ampicilina;  
10 mL de água deionizada.
- Polimixina-B (10 mg/mL)  
20 mg de Polimixina-B (Sigma);  
2 mL de PBS.
- Ciprofloxacino (8 mg/mL)  
80 mg de ciprofloxacino (Sigma);  
10 mL PBS ajustado com 0,1 N HCl até a solubilização do antibiótico.

## **Anticorpos**

- Solução de anticorpo anti-antígeno eritrocitário do tipo B  
Anticorpo monoclonal Anti-B (Fresenius Kabi);  
Diálise com PBS em Centricon 10 kDa;  
Quantificação por reagente de Bradford;  
Esterilização por filtração (0,22  $\mu\text{m}$ ).

