



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBIO – INTERAÇÃO)

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PERFIL DE VIRULÊNCIA DE CEPA CLÍNICA
DE *Shigella flexneri* ISOLADA EM MANAUS - AM

FERNANDA DE ALMEIDA BATALHA

Manaus - AM

2019



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

FERNANDA DE ALMEIDA BATALHA

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PERFIL DE VIRULÊNCIA DE CEPA CLÍNICA DE *Shigella flexneri* ISOLADA EM MANAUS - AM

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Biologia da interação Patógeno – Hospedeiro, área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

Orientadora: Prof. Dra. PATRÍCIA PUCCINELLI ORLANDI

Co-orientadora: Prof. Dra. ISABELLE BEZERRA CORDEIRO

Manaus - AM

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

B328a

Batalha, Fernanda de Almeida.

Análise proteômica do perfil de virulência de cepa clínica de *Shigella flexneri* isolada em Manaus - AM. / Fernanda de Almeida Batalha. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

165 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Puccinelli Orlandi.

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Isabelle Bezerra Cordeiro.

1. Doenças diarreicas 2. *Shigella* 3. Virulência I. Título

CDU 579.842.1/2 (811.3) (043.3)

CDD 579.34098113

22. ed.

Dedico este trabalho aos meus pais, os maiores incentivadores dessa jornada. Aos amigos, pelo suporte valioso e à minha família pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo presente da vida e por atender aos desejos do meu coração.

Aos meus pais, Francisco e Arlene, essa vitória sempre foi de vocês, e ao meu irmão por sempre estar disposto a me ajudar, você fez parte dessa conquista.

À toda a minha família, pelas orações, felicitações e apoio em todas as horas. Em especial aos meus tios Alison e Alcinéia que estão ao meu lado no que der e vier.

A minha orientadora, Dra. Patrícia Orlandi, por sempre acreditar no meu potencial, confiar a mim tamanha responsabilidade e sempre abrir as portas de grandes oportunidades.

À minha co-orientadora, Dra. Isabelle Cordeiro, a rainha da proteômica, sem você eu não teria chegado tão longe nesse novo universo que conheci.

Aos amigos de laboratório, que compartilharam comigo os dias de luta e os dias de glória: Juliane, Ruth, João, Paloma, Késsia, Edilene, Walter, Jennifer, Felipe, Dr. André, Natália, Alessandra, Lucas, Daniel, Diene, Ivanildes, Eliz, Gleice, Welligton, Danielle, Yury, Lorena, Yago, Diogo e em especial à Paula Taquita, por toda paciência e dedicação que sempre foram disponíveis a mim, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos técnicos, professores, secretárias que também participaram deste processo. Também agradeço aos colegas de turma, sofremos e vencemos juntos e estreamos a primeira turma do PPGBIO-INTERAÇÃO, foi muito bom contar com vocês.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o sucesso desse trabalho.

RESUMO

Shigella spp. é um dos principais enteropatógenos responsáveis pelas mortes relacionadas às doenças diarreicas, especialmente entre crianças menores de cinco anos. Esforços têm sido realizados para que haja o controle e diminuição de mortes em todo o mundo, como pesquisas que forneçam dados para o auxílio da compreensão da patogênese deste microrganismo. Uma das abordagens utilizadas para este fim é a proteômica, com destaque para a identificação de proteínas associadas ao perfil virulento deste gênero. Como estratégia, no presente trabalho, foi utilizada a indução da ativação do mecanismo de invasão da espécie clínica de *Shigella flexneri* e uma cepa de referência, a fim de investigar proteínas que pudessem estar envolvidas na virulência apresentada pela cepa clínica isolada em Manaus – AM. A identificação proteica permitiu a identificação de vias metabólicas essenciais e funções de diversas proteínas relacionadas à resposta ao estresse biológico e de sobrevivência celular, além da detecção de classes proteicas como as acetiltransferases, proteínas membranares e vesiculares, apontadas como alvos para futuras explorações, uma vez que estas participam de processos chaves como adaptação, invasão, transferência horizontal de genes e carreamento de toxinas. Diante disto, a proteômica foi uma ferramenta fundamental para descrever informações associadas a mecanismos relacionados à patogênese de *S.flexneri*, além de possibilitar a exploração de características desta cepa regional isolada na região Norte do país, onde há escassez de dados desta natureza.

Palavras-chave: *Shigella*, proteômica, virulência.

ABSTRACT

Shigella spp. is one of the major enteropathogens responsible for deaths related to diarrheal diseases, especially among children under five years of age. Efforts have been made to control and reduce deaths worldwide, as research that provides data to help to understand the pathogenesis of this microorganism. One of the approaches used for this purpose is proteomics, with emphasis on the identification of proteins associated with the virulent profile of this genus. As a strategy, in the present work, induction of the activation of the mechanism of invasion of the clinical species of *Shigella flexneri* and a reference strain was used to investigate proteins that could be involved in the virulence presented by the isolated clinical strain in Manaus - AM. Protein identification allowed the identification of essential metabolic pathways and functions of several proteins related to the response to biological stress and cell survival, as well as the detection of protein classes such as acetyltransferases, membrane and vesicular proteins, pointed as targets for future explorations, once that they participate in key processes such as adaptation, invasion, horizontal transfer of genes and the carrying of toxins. Because of this, proteomics was a fundamental tool to describe information associated with mechanisms related to the pathogenesis of *S.flexneri*, in addition to enabling the exploration of characteristics of this isolated regional strain in the North region of the country, where there is a shortage of data of this nature.

Key words: *Shigella*, proteomic, virulence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM – Amazonas

AMPs – Peptídeos Antimicrobianos

°C – grau Celsius

µg – microgramas

1D – uma dimensão

2D – duas dimensões

CRISPR – Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Inter Espaçadas

CNPq – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

D.O – Densidade Óptica

DCDIA – Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia

DTT –Ditiotreitol

DOC – Desoxicolato

EB – Evans Blue

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

ESI – Ionização por Electrospray

ESI-QTOF – Ionização por Electrospray associada ao analisador Quadrupolo com Tempo de Voo

ESRs – Envelope Stress Responses

FTPMSF- phenylmethanesulfonyl fluoride

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

h – Horas

IAA – Iodoacetamida

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano

KEGG – Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto

LB – Lúria-Bertani

LC-MS – Espectrometria de Massa acoplada à Cromatografia Líquida

LNBio – Laboratório Nacional de Biociências

LPS – Lipopolissacarídeo

M – Molar

mA – Miliampère

MG – Minas Gerais

MP3 – Predição de Proteínas Patogênicas em Dados Metagenômicos

MS – Espectrometria de Massa

m/z – Razão massa – carga

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PATH – Program for Appropriate Technology in Health

pH – Potencial Hidrogeniônico

PMN – Células Polimorfonucleares

PPGIO-Interação – Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro

ppm – partes por milhão

PSORT–Protein Subcellular Localization Prediction Tool

RO – Rondônia

sRNAs – Pequenos RNAs bacterianos

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SST3 – Sistema de Secreção do tipo III

STRING – Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes

TCA – Ácido Tricoló Acético

v/v – volume/volume

VC – Vermelho Congo

OMPs – Proteínas de Membrana Externa

OMS – Organização Mundial de Saúde

OMVs – Vesículas de Membrana Externa

Panther DB – Panther Data Base Classification System

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais efetores envolvidos na patogênese de <i>Shigella</i> spp.	29
Tabela 2: Características da cepa clínica em estudo.	43
Tabela 3: Dosagem de proteínas intracelulares e extracelulares das cepas utilizadas no estudo.	54
Tabela 4: Total de proteínas identificadas no extrato extracelular e intracelular. ..	58
Tabela 5: Total de proteínas intracelulares identificadas para as cepas clínica e de referência de <i>S. flexneri</i>	60
Tabela 6: Principais proteínas de atividade catalítica encontradas na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.	65
Tabela 7: Total de proteínas patogênicas identificadas em ambas as cepas.	76
Tabela 8: Proteínas patogênicas exclusivas identificadas em ambas as cepas. ..	76
Tabela 9: Proteínas patogênicas exclusivas da cepa clínica de <i>S. flexneri</i> str.201.77	
Tabela 10: Proteínas extracelulares diferenciais em meio LB identificadas na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.	111
Tabela 11: Proteínas extracelulares diferenciais em meio VC identificadas na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.	114
Tabela 12: Proteínas extracelulares comuns em meio LB e VC identificadas na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.	115
Tabela 13: Proteínas intracelulares diferenciais em meio LB identificadas na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.	117
Tabela 14: Proteínas intracelulares diferenciais em meio VC identificadas na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.	130
Tabela 15: Proteínas intracelulares comuns em meio LB e VC identificadas na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.	134
Tabela 16: Proteínas intracelulares diferenciais em meio LB identificadas na cepa de referência <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.	140
Tabela 17: Proteínas intracelulares diferenciais em meio VC identificadas na cepa de referência <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.	149
Tabela 18: Proteínas intracelulares comuns em meio LB e VC identificadas na cepa de referência <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proporção de aumento crescente de <i>S. sonnei</i> em relação a <i>S. flexneri</i> em 100 países entre os anos de 1990 a 2014.	19
Figura 2: Incidência de Shigelose entre os anos de 1984 a 2005 por região geográfica.....	20
Figura 3: Estimativa de casos de shigelose relatados em 178 países entre os anos de 2012 a 2017.	22
Figura 4: Esquema de invasão intracelular de <i>Shigella</i> spp.....	26
Figura 5: Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo III (SST3).	30
Figura 6: Representação esquemática do Sistema de Ionização por Electrospray (ESI).	38
Figura 7: Fluxo de trabalho empregado em técnicas proteômicas.	39
Figura 8: Principais atividades do projeto.....	42
Figura 9: <i>Shigella flexneri</i> cepa str.201 apresenta crescimento similar em meios LB e VC.	53
Figura 10: Faixas selecionadas para excisão de bandas de proteínas extracelulares da cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201 em gel unidimensional.	55
Figura 11: Faixas selecionadas para excisão de bandas de proteínas intracelulares da cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201 em gel unidimensional, com suas triplicatas.	56
Figura 12: Faixas selecionadas para excisão de bandas de proteínas intracelulares da cepa referência de <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T em gel unidimensional, com suas triplicatas.	56
Figura 13: Diagrama de Venn das proteínas intracelulares identificadas na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	59
Figura 14: Diagrama de Venn das proteínas intracelulares identificadas na cepa de referência <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.....	60
Figura 15: Diagrama de Venn da comparação do perfil proteômico intracelular entre a cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201 e cepa de referência <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.....	61

Figura 16:Diagrama de Venn da comparação do perfil proteômico extra e intracelular da cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	62
Figura 17: Localização celular das proteínas intracelulares exclusivas presentes em meio LB pertencentes à cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	63
Figura 18: Localização celular das proteínas intracelulares exclusivas presentes em meio VC pertencentes à cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	63
Figura 19: Função molecular de proteínas intracelulares exclusivas em Vermelho Congo na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	64
Figura 20: Rede de interação proteica de proteínas intracelulares exclusivas sob a condição de Vermelho congo na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	67
Figura 21: Interações entre as proteínas AccB e Pta, oriundas da cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> submetida à indução de Vermelho Congo.	69
Figura 22: Interações entre as proteínas TolB, Lppe e OmpA, oriundas da cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201 submetida à indução de Vermelho Congo.	73
Figura 23: Estrutura tridimensional da chaperona periplasmática Skp (OmpH) de <i>Escherichia coli</i>	84
Figura 24: Diagrama de Venn de proteínas extracelulares identificadas na cepa de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	87
Figura 25: Localização celular das proteínas extracelulares exclusivas presentes em meio LB pertencentes à cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	89
Figura 26: Localização celular das proteínas extracelulares exclusivas presentes em meio VC pertencentes à cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	89
Figura 27: Função molecular de proteínas extracelulares exclusivas em Vermelho Congo na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	90
Figura 28: Rede de interação proteica de proteínas extracelulares exclusivas sob a condição de Vermelho congo na cepa clínica de <i>Shigella flexneri</i> str.201.....	91

SUMÁRIO

1.	Introdução	16
2.	Revisão de Literatura	18
2.1.	<i>Shigella</i> spp.	18
2.2.	Epidemiologia	19
2.3.	Epidemiologia no Brasil	22
2.4.	Shigelose e sua patogênese	25
2.4.1.	Invasão	27
2.5.	Sistema de Secreção Proteica	28
2.5.1.	Sistema de Secreção do Tipo III (SST3)	28
2.5.1.1.	Ativação de SST3 através da indução por Vermelho Congo	30
2.6.	Proteômica	31
2.6.1.	Proteômica Bacteriana	33
2.6.1.1.	Proteínas extracelulares - Exoproteoma Bacteriano	34
2.7.	Proteínas intracelulares	35
2.8.	Ferramentas Proteômicas	36
2.8.1.	Eletroforese Unidimensional e Espectrometria de Massas	37
3.	Justificativa	40
4.	Objetivos	41
4.1.	Objetivo Geral	41
4.2.	Objetivos Específicos	41
5.	Material e Métodos	42
5.1.	Fluxograma de trabalho	42
5.2.	Reativação das cepas e condições de crescimento bacteriano	42
5.3.	Curva de crescimento bacteriano	43
5.4.	Extração Proteica – Ambiente extracelular	44

5.5.	Extração Proteica – Ambiente intracelular	44
5.6.	Precipitação e dosagem de proteínas	45
5.7.	Análise eletroforética unidimensional	46
5.8.	Proteólise <i>in gel</i> e para submissão à ESI-LC-MS / MS	46
5.9.	Análises de bioinformática	49
5.9.1	Localização celular	49
5.9.2	Diagramas de comparação	49
5.9.3	Redes biológicas	50
5.9.4	Classificação biológica	51
5.9.5	Predição de proteínas patogênicas	51
6.	Resultados e Discussão	52
6.1.	<i>Shigella flexneri</i> str.201 apresenta crescimento similar em meios LB e VC.	52
6.2.	Perfil proteômico da cepa clínica e da cepa selvagem por análise eletroforética em 1-D.	54
6.3.	Análise ESI-LC-MS / MS	57
6.3.1	Anotação e identificação de proteínas da cepa clínica e de referência.	57
6.4.	Identificação de Proteínas intracelulares das cepas de <i>S. flexneri</i>	58
6.4.1	Proteínas exclusivas em Vermelho Congo – Cepa Clínica	62
6.4.1.1	Localização celular	62
6.4.1.2	Funções Moleculares e Interações proteicas	64
6.4.1.3	Predição de Proteínas Patogênicas	76
6.5.	Proteínas extracelulares identificadas de <i>S. flexneri</i> str.201	86
6.5.1	Proteínas exclusivas em Vermelho congo – Cepa Clínica	87
6.5.1.1	Localização Celular	87
6.5.1.2	Funções Moleculares e Interações proteicas	89

6.5.1.3	Predição de Proteínas Patogênicas	92
7.	Conclusão	94
8.	Referências Bibliográficas	96
9.	Apêndice	111

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças diarreicas ainda afetam crianças em todo o mundo, principalmente menores de cinco anos e, embora possam ser evitadas com medidas simples, como disponibilidade ao acesso à água potável e saneamento básico, ainda são um grave problema de saúde na população. Acredita-se que ocorra 1,5 milhões de mortes anualmente atribuídas às doenças diarreicas, sendo considerada uma doença de significativa morbidade e mortalidade (UNICEF 2013, WHO 2014, The et al. 2016).

Além das mortes, sucessivos episódios de diarreia comprometem a situação socioeconômica das áreas endêmicas e o desenvolvimento físico e intelectual das crianças afetadas. As consequências de infecções contínuas, em longo prazo, são drásticas e se manifestam, por exemplo, através de deficiências no crescimento, maior susceptibilidade a outros patógenos e doenças crônicas como a diabetes (Das et al., 2013; PATH, 2016).

Dentre os principais patógenos causadores da diarreia, a *Shigella* destaca-se como uma bactéria capaz de desenvolver severas infecções. A disseminação de cepas com alta capacidade de transferência de fatores de virulência e que são capazes de causar danos severos ao hospedeiro têm sido fatores preocupantes, tendo em vista que ainda não há uma vacina eficaz contra *Shigella* spp. (Walker et al. 2013, Njamkepo et al. 2016, The et al. 2016).

Embora este contexto se dê a nível global, no Brasil, mais especificamente na região Norte do país, poucos estudos são direcionados à compreensão dos diferentes aspectos deste patógeno, seja na vigilância epidemiológica, na compreensão de mecanismos relacionados à patogênese ou em estratégias para seu diagnóstico, controle e tratamento.

Estudos epidemiológicos realizados no ano de 2007 a 2009 pelo nosso grupo de pesquisa, Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia – DCDIA, identificaram a *Shigella* como o 4º patógeno bacteriano mais recorrente

em crianças com diarreia atendidas em hospitais públicos de Manaus - AM (Cruz et al. 2014).

O grupo também verificou a presença de genes de virulência entre as amostras isoladas, os quais estavam relacionados à sintomatologia apresentada pelos pacientes. Nesse estudo, o principal resultado revelou que genes como Shet1B e Shet2 tinham relação com sintomas como desidratação e presença de sangue nas fezes, respectivamente. Além destes, os genes da família ipa, como IpaBCD foram localizados em todos os isolados, assim como os genes IpaH7.8, set-1A, set-1B, sen/ospD3, virF, e invE (Cruz et al. 2014).

Diante deste cenário buscou-se analisar se estes isolados, que apresentavam genes relacionados tanto a virulência quanto a sintomatologia, eram capazes de gerar variabilidade na resposta imunológica em cobaias infectadas e quais os genes mais expressos no momento de invasão celular.

Dentre os isolados avaliados, destacamos o potencial imunogênico da cepa *S.flexneri* strain 201, a qual manifestou maior capacidade invasora, maior letalidade e alterações morfológicas no tecido infectado como hemorragia, intensa infiltração celular e com destruição de epitélios bronquiais e alveolares, quando comparada à cepa de referência no estudo (Serra, 2013). Além disso, este isolado apresentou expressão gênica semelhante à cepa de referência para os principais efetores associados ao processo de invasão celular.

Uma vez que ainda não se conhece a totalidade dos efetores que são secretados por este patógeno, todo o mecanismo da patogênese de *Shigella* continua sendo alvo de novas investigações, principalmente através da abordagem proteômica (Yu et al. 2017).

Neste estudo, propomos a identificação de proteínas intra e extracelulares oriundas da cepa clínica isolada na região. Acreditamos que a identificação do perfil proteômico tem o potencial de auxiliar na compreensão de como as diferenças genéticas apresentadas pela cepa de estudo refletem no proteoma, fornecendo bases para futuras pesquisas.

2. Revisão de Literatura

2.1. *Shigella* spp.

Shigella spp. é um patógeno bacteriano Gram-negativo, caracterizado como um bacilo anaeróbio facultativo, pertencente à família das enterobactérias. Esse gênero possui diversos sorotipos e sub sorotipos, que estão divididos entre as quatro espécies existentes, sendo elas: *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* (Jennison; Verma, 2004; Marteyn; Gazi; Sansonetti, 2012). A diferenciação das espécies é definida através da variação do antígeno-O, que está presente no lipopolissacarídeo (LPS) na membrana celular bacteriana (Schroeder & Hilbi 2008, Shashkov et al. 2013).

Esse patógeno entérico foi primeiramente descrito em 1897, por Kiyoshi Shiga, sendo nomeado como *Shigella*, em referência ao mesmo (Mattock & Blocker 2017). O causador da disenteria bacilar ou shigelose é frequentemente isolado de pacientes com diarreia, afetando milhares de pessoas todos os anos, incluindo principalmente crianças menores de cinco anos entre os casos relatados em todo o mundo (WHO 2014).

Esta bactéria é transmitida pela via fecal-oral, sendo capaz de colonizar o trato gastrointestinal. Possui uma alta taxa de infecção, necessitando apenas de uma pequena dose infecciosa para desencadear a doença em humanos, cerca de 10 a 100 bactérias. Além disso, a infecção por *Shigella* provoca mudanças nas respostas imunológicas do hospedeiro, alta taxa de letalidade e complicações quando associados a outras patologias (Zaidi & Estrada-García 2014).

A distribuição geográfica deste gênero, assim como de outros patógenos diarreicos, está associada a más condições de higiene, ausência de água tratada e saneamento básico. Como exemplo, temos a prevalência de isolados de *S.flexneri* em países menos desenvolvidos e de *S.sonnei* em países mais industrializados (Cairncross et al, 2010;Thompson et al, 2015).

2.2. Epidemiologia

Shigella spp. está entre os principais patógenos causadores da diarreia moderada a grave em crianças menores de cinco anos. Dados de 2005 a 2015 revelam que este gênero é classificado como o segundo maior causador de mortes por diarreia, além de ser o terceiro maior responsável pela morte de crianças menores de cinco anos. Foram estimadas 63.100 mortes por *Shigella* spp. no ano de 2015, em crianças menores de cinco anos, em países de baixo desenvolvimento (Anderson et al. 2019; Troeger et al. 2017).

As espécies responsáveis pela maioria das infecções são *S.flexneri* e *S.sonnei*, em países em desenvolvimento e países desenvolvidos, respectivamente. Contudo, há o aumento crescente da espécie de *S.sonnei* em relação à *S.flexneri* (Figura 1) (Kotloff et al. 2017).

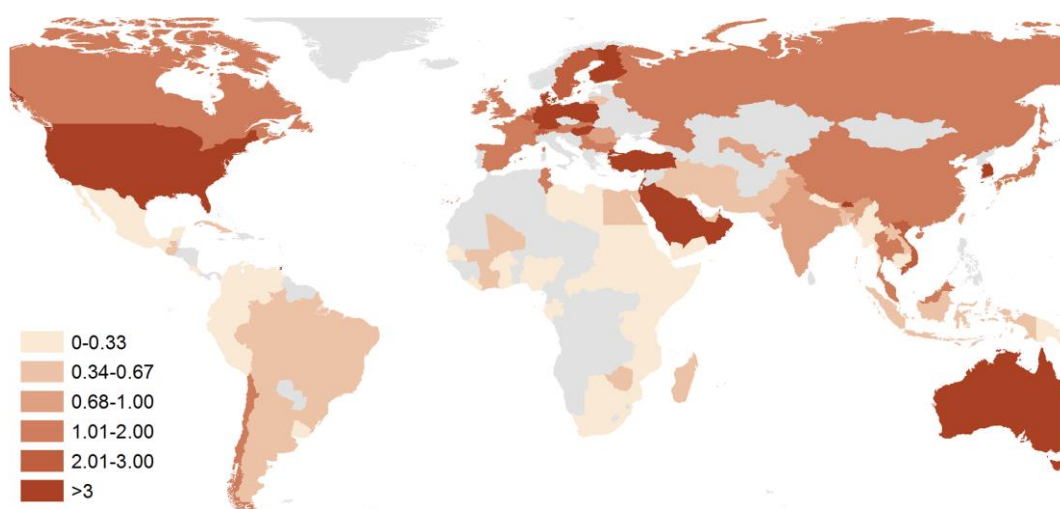


Figura 1: Proporção de aumento crescente de *S. sonnei* em relação a *S. flexneri* em 100 países entre os anos de 1990 a 2014.

As cores mais escuras indicam a maior proporção de *S.sonnei*, enquanto as cores mais claras sinalizam a proporção da espécie de *S.flexneri*. As áreas na cor cinza indicam que não há dados publicados para estas informações. Fonte: Thompsom et al, 2015.

Já a espécie de *S.boydii* é comumente encontrada em regiões da Ásia e *S.dysenteriae* foi responsável por grandes surtos na década de 60, não sendo tão comumente isolada (Anderson et al. 2016).

Durante os anos de 1984 a 2005, foram estimados 0,6 a 107 episódios de shigelose a cada 1000 pessoas por ano, no entanto esta revisão se limitou a países de baixo a médio Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), não contemplando a África Subsaariana (Figura 2). Além disso, a espécie de maior prevalência no estudo foi *S. flexneri*, com 57% dos isolados (Ram et al. 2008).

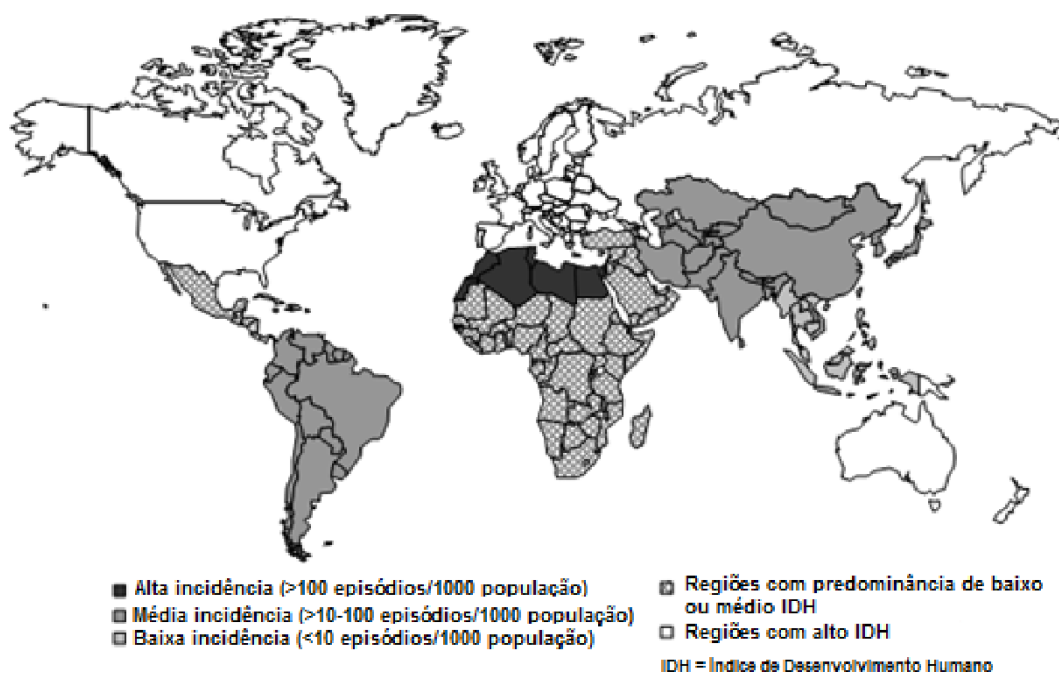


Figura 2: Incidência de Shigelose entre os anos de 1984 a 2005 por região geográfica.

Último mapa publicado ilustrando a incidência de shigelose, de acordo com o número de episódios a cada 1000 habitantes na população avaliada, em países de baixo Índice de Desenvolvimento Humano. Fonte: Adaptado de Ram, 2008.

Os casos de shigelose são reportados em todo o mundo, no entanto, a maior incidência está concentrada em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e África (Zaidi & Estrada-García 2014), como demonstrado em um estudo multicêntrico, realizado entre os anos de 2007 a 2011, que visou à identificação dos agentes etiológicos das doenças diarreicas na população em idade pediátrica (0 a 59 meses) de quatro regiões da África e três da Ásia. Neste estudo, *Shigella* spp. estava entre os principais causadores da diarreia, acometendo principalmente crianças (de 24 a 59 meses) com o quadro de moderado a grave de disenteria, num total de 78,4% dos casos para esta categoria (Kotloff et al. 2013).

Lívio e colaboradores apontaram que, em dados provenientes desse mesmo estudo, as espécies mais identificadas foram *S. flexneri* (65,9%) e *S. sonnei* (23,7%), do total de 1130 amostras analisadas (Kotloff et al. 2013, Livio et al. 2014).

Na América Latina, este patógeno foi detectado em surtos diarreicos, como na região metropolitana do Chile, nos anos de 2005 a 2010, onde *Shigella* spp. foi a segunda bactéria mais isolada em amostras provenientes de surtos alimentares, com total de 20,4% em 2.434 surtos. Este resultado aponta que medidas higiênicas devem ser adotadas com mais rigor na manipulação de alimentos, uma vez que, tanto agentes bacterianos como virais e parasitários também foram identificados (Viller Alerte et al. 2012).

No Peru entre os anos de 2008 a 2011, *Shigella* spp. estava dentre os patógenos associados à diarreia em crianças de 12 a 18 meses, com 6,6% dos isolados do total de 915 amostras fecais oriundas de crianças que apresentavam episódios desta infecção (Ochoa et al. 2013). Já na capital Argentina, a incidência de *Shigella* spp. em áreas urbanas contou com 187 casos por ano a cada 100.000 crianças nos anos de 2009 e 2010, com prevalência da espécie de *S. flexneri* (66,8%), sendo esta incidência associada à precárias condições sanitárias de água e esgoto nesta localidade, o que favorece a contaminação por este patógeno (Rolfo et al. 2012).

A literatura carece de informações atualizadas sobre a situação epidemiológica global sobre os casos de diarreia por *Shigella* spp. Sabendo dessa

deficiência, o grupo DCDIA realizou o levantamento de dados epidemiológicos relatados entre os anos de 2012 a 2017 oriundos de 178 países (Figura 3). As publicações utilizadas no levantamento também incluíam dados de morbidade, mortalidade, distribuição etária, distribuição geográfica, distribuição temporal e medidas preventivas específicas do patógeno e diagnósticos de *Shigella* (Dados não publicados).

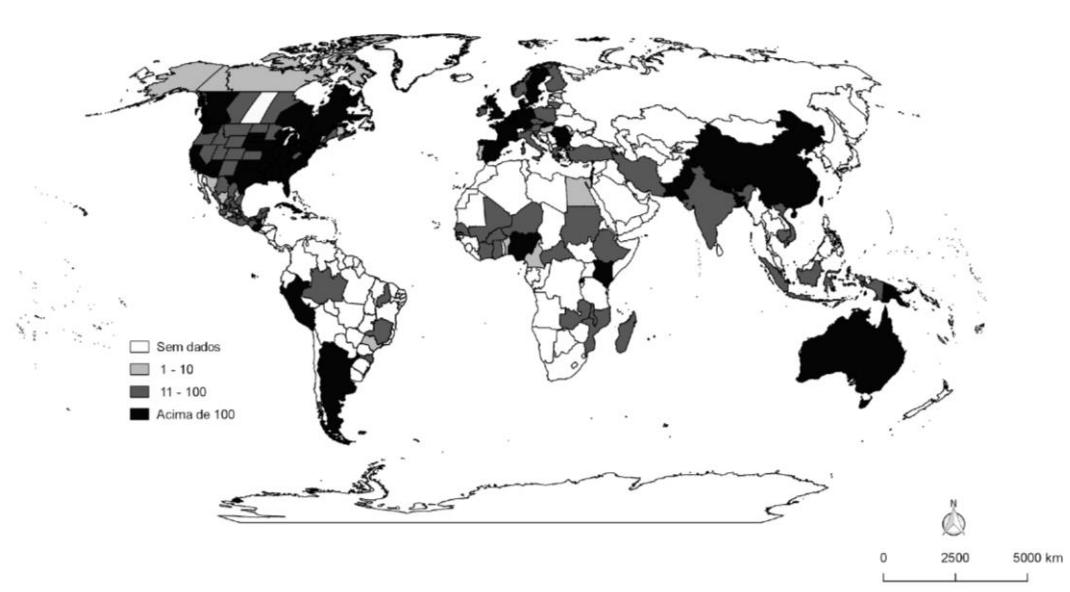


Figura 3: Estimativa de casos de shigelose relatados em 178 países entre os anos de 2012 a 2017.

Fonte: Grupo DCDIA.

2.3. Epidemiologia no Brasil

No cenário brasileiro, *Shigella* spp. também é identificada como um dos principais patógenos entéricos causadores da diarreia, com prevalência das espécies de *S.flexneri* e *S.sonnei*(Peirano et al. 2006, Angelini et al. 2009).

Dados recentes do PATH (Program for Appropriate Technology in Health), disponível em: <<http://www.defeatdd.org/cascading-burden/#11>>, mostram que em 2015, a estimativa de mortes causadas por doenças diarreicas, entre crianças menores de cinco anos, era de 72.000 a cada 100.000 no Brasil e dessas, 51%

estavam infectadas com *Shigella*, quando comparado com *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), que totalizava 49% das infecções (PATH, 2016).

Em nosso país, a distribuição geográfica das espécies mais prevalentes também está associada às condições básicas de saneamento, mostrando que regiões mais desenvolvidas nesse aspecto tendem a apresentar a espécie de *S.sonnei* em estudos epidemiológicos, como visto no estudo de Souza e colaboradores (2013), em Belo Horizonte – MG, que identificou *S.sonnei* predominando entre os isolados. O objetivo do estudo foi avaliar a prevalência deste patógeno, assim como a susceptibilidade a antibióticos e a presença de fatores de virulência. Como resultado, 88,2% dos isolados, de 157 amostras fecais, foram identificados com a espécie de *S.sonnei*, seguido por 11,8% de *S.flexneri* (Sousa et al., 2013).

De acordo com Peirano e colaboradores (2006), as maiores incidências de shigelose se encontram na região Sudeste (39%), Nordeste (34%) e Sul (3%) do Brasil, no entanto, poucos são os dados disponíveis na região Norte do país (Peirano et al. 2006).

Orlandi e colaboradores investigaram os principais patógenos associados a episódios diarreicos, na cidade de Porto Velho – RO entre os anos de 2000 a 2002, e constataram que em 5,1% dos casos de diarreia aguda, do total de 470 crianças com até 72 meses de idade, foi identificado o gênero de *Shigella*, sendo o terceiro patógeno bacteriano mais encontrado nessas amostras (Orlandi et al. 2006).

No Pará, a espécie de *S.flexneri* também foi prevalente em um estudo avaliando a resistência antimicrobiana em 122 cepas de *Shigella* isoladas de pacientes com diarreia em diferentes cidades do estado, entre os anos de 1979 a 2009. Na análise, foram identificadas mais de 60% sendo da espécie de *S.flexneri*, seguido por aproximadamente 33% da espécie de *S.sonnei* (Bastos & Loureiro 2011).

Rocha e colaboradores também investigaram a presença deste patógeno em uma análise microbiológica do caldo de cana comercializado na cidade de Ji-

Paraná – RO, constatando que 80% das amostras estavam contaminadas com *Shigella* spp., demonstrando que apesar desta bactéria não ter sido isolada a partir de amostras fecais, esse alimento pode ser considerado uma fonte de disseminação ao ser ingerido pelo ser humano, uma vez que, este resultado indica falta de higienização na manipulação e preparo desta bebida (Rocha et al. 2016).

Cruz e colaboradores em Manaus – AM identificaram 30 cepas de *Shigella* spp. a partir de amostras de fezes de 1.339 crianças com idade de 0 a 10 que apresentavam sintomas de shigelose em diferentes hospitais da cidade. Neste estudo, as espécies mais prevalentes foram de *S. flexneri* e *S. sonnei*, com 60% e 22,2% dos casos, respectivamente. Além disso, outros patógenos associados à diarreia também foram encontrados no estudo, o que corrobora com a deficiência do sistema de saneamento básico da cidade, favorecendo a disseminação dos principais agentes etiológicos da diarreia (Cruz et al. 2014).

2.4. Shigelose e sua patogênese

Shigella pode causar sucessivas infecções, ou seja, os que sobrevivem a esta patologia estão vulneráveis às consequências a longo prazo desta doença, visto que o indivíduo que é acometido por quadros contínuos de shigelose sofre intensos danos intestinais, o que resulta na má absorção de nutrientes, invasão de patógenos indesejados na microbiota intestinal, entre outros danos que comprometem a integridade tecidual dessa região (Teo et al., 2012; PATH, 2016).

A patogênese da *Shigella* é caracterizada pela invasão na região do cólon e do íleo, com disseminação para a mucosa epitelial do intestino. Inicialmente a bactéria atravessa o lúmen intestinal e alcança as células M, que servem como porta de entrada para a região da submucosa intestinal, sofrendo o processo de transcitose. Em seguida, o patógeno entra em contato com células de defesa do hospedeiro, como os macrófagos e linfócitos B e T, no entanto, a *Shigella* escapa desta defesa e chega às células epiteliais, onde ativa seu sistema de secreção proteica para protrusão e invasão celular, com disseminação do tipo basolateral entre elas. Esta atividade invasiva vence a barreira natural de defesa das células epiteliais, que é o muco secretado, chamado de mucina, fazendo com que a bactéria adentre na mucosa e inicie o processo de infecção no hospedeiro (Jennison & Verma 2004, Sperandio et al. 2013).

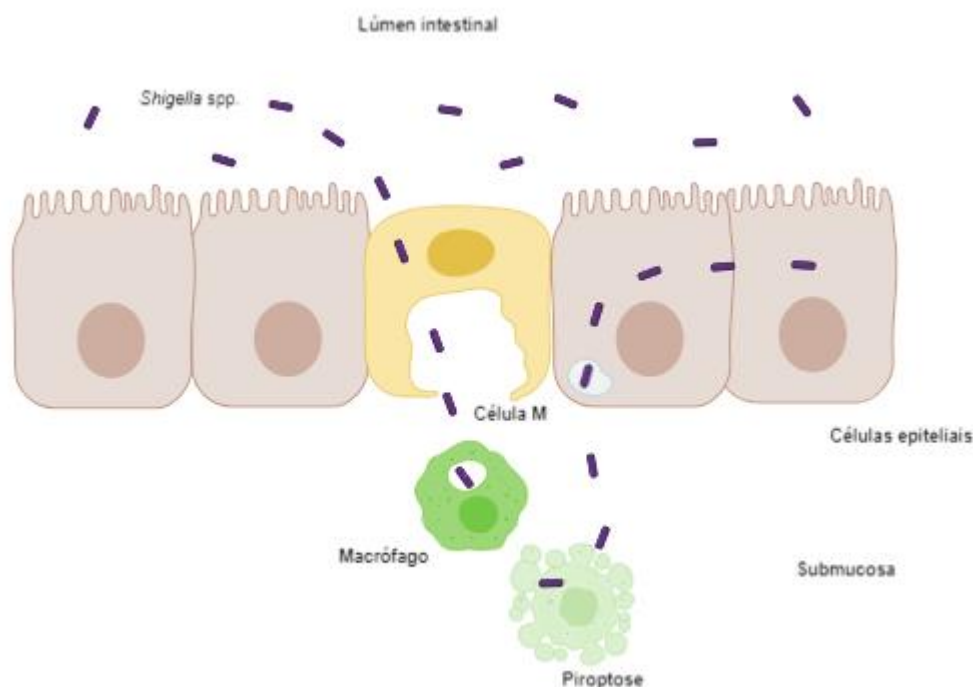


Figura 4: Esquema de invasão intracelular de *Shigella* spp.

O processo de invasão celular ocorre pela transcitose bacteriana através das células M, chegando então na submucosa intestinal onde entra em contato com células de defesa do hospedeiro, como os macrófagos residentes. No entanto, esse patógeno é capaz de escapar do ataque desta célula, lizando-a e prosseguindo para o contato com as células epiteliais, onde o SST3 é ativado, promovendo a liberação de proteínas efetoras que facilitam a sua entrada célula. Após esta entrada, a disseminação bacteriana ocorre basolateralmente e a infecção é propagada.

O processo de infecção está dividido em quatro partes principais, que são a adesão, invasão, replicação e disseminação bacteriana. Tais etapas envolvem a ativação do sistema imunológico, como a liberação de citocinas no quadro de inflamação, além da liberação de proteínas e fatores de virulência que contribuem para o estabelecimento da doença (Kotloff et al. 2017, Mattock & Blocker 2017).

Após a sua instalação, esse patógeno é capaz de causar danos a mucosa do intestino, levando a uma série de manifestações clínicas como: febre, cólicas abdominais, diarreia com sangue e muco, desidratação e prolapso retal (Pal 2014, Kotloff et al. 2017). Embora o corpo humano apresente um pH muito baixo no trato gastrointestinal, a *Shigella* possui mecanismos de sobrevivência em condições não ideais, como a capacidade de expressão das proteínas HDEA e HDEB que

permitted sua resistência a um pH fora da sua faixa ideal de crescimento (Marteyn; Gazi; Sansonetti, 2012).

Outras alterações podem ocorrer como modulação da resposta do hospedeiro, como a inibição da migração células T, alteração de vias metabólicas e outras condições de defesa celular como osmolaridade, temperatura, disponibilidade de oxigênio e ação enzimática (Schroeder; Hilbi, 2008; Konradt et al., 2011).

2.4.1. Invasão

O fenótipo invasivo da *Shigella* está relacionado à presença de um grande plasmídeo de virulência ou plasmídeo *inv*, que apresenta o *operon mxi-spa* que codifica o Sistema de Secreção do Tipo III (SST3), responsável pela internalização bacteriana e injeção de proteínas efetoras no citoplasma da célula hospedeira (Jennison & Verma 2004, Killackey et al. 2016). Este aparato apresentado pela *Shigella* e também por outras bactérias Gram-negativas é semelhante a uma estrutura de agulha, que serve como porta de entrada transmembranar de translocação proteica e de ancoragem do patógeno para que se inicie o processo de infecção e destruição das células do epitélio intestinal do hospedeiro (Kaur et al. 2016).

Neste processo, *Shigella* utiliza diversas proteínas que facilitam a sua entrada e deslocamento na célula hospedeira, uma vez que a mesma é desprovida de flagelo, ou seja, é imóvel. Como forma de motilidade, a polimerização de actina é usada para invasão às células vizinhas, através da formação de estruturas semelhantes a filamentos, tal mecanismo conta com auxílio de uma proteína de membrana externa, chamada IcsA, que além de promover o contato bacteriano à célula, também é caracterizada como um fator de virulência e é capaz de interagir com outras proteínas, como a IcsB, que evita a ação autofágica deste microrganismo, favorecendo assim a sua disseminação (Brotcke Zumsteg et al., 2014; Agaisse, 2016; Pizarro-Cerdá et al., 2016).

Para a ancoragem deste patógeno às células hospedeiras, são liberadas adesinas, como as proteínas OspE1 / OspE2, que se ligam as células do epitélio intestinal (Faherty et al. 2012). Após a entrada do patógeno, o sistema imunológico é ativado, com o recrutamento das células polimorfonucleares (PMN), além disso, o patógeno entra em contato com células dendríticas e linfócitos ativos, o que contribui para desestabilização do epitélio celular, facilitando sua difusão para as células adjacentes (Kim et al. 2010, Konradt et al. 2011, Carayol & Van Nhieu 2013).

2.5. Sistema de Secreção Proteica

2.5.1. Sistema de Secreção do Tipo III (SST3)

Os microrganismos apresentam diferentes formas de adaptação e mecanismos de ancoragem ao seu hospedeiro para que sua sobrevivência seja garantida. Na busca pela sobrevivência, muitos deles secretam substâncias que promovem o sucesso do seu estabelecimento em um nicho específico, como por exemplo, as bactérias, que são capazes de secretar diversas proteínas através de sistemas complexos e que acabam causando danos ao seu hospedeiro (Green, Erin R.; Mecsas 2016).

Muitas bactérias patogênicas Gram-negativas utilizam o sistema de secreção do tipo III (SST3), encontrado em bactérias que infectam o trato gastrointestinal, para introduzir proteínas, codificadas por genes de virulência, em células eucarióticas (Xingminget *al.*, 2006). As bactérias usam SST3 para translocar proteínas efetoras através das membranas fosfolipídicas injetando-as no citoplasma das células hospedeiras (Figura 5) (Mota et al. 2005).

As principais proteínas secretadas por este sistema estão listadas na tabela abaixo:

Tabela 1: Principais efetores envolvidos na patogênese de *Shigella* spp.

Gene name	Função	Referência
IcsA	Adesina necessária para o contato celular;	(Brotcke Zumsteg et al. 2014)
IcsB	Impede a ação autofágica;	(Ogawa et al. 2005)
IpaA,ipaB,ipaC,ipaD	Conjunto de proteínas responsáveis pela invasão celular no hospedeiro;	(Ménard et al. 1996)
IpgD	Reorganização do filamento de actina; participa do processo de formação de vesículas;	(Niebuhr et al. 2002)
ospB	Modulador da resposta inflamatória do hospedeiro principalmente no estágio inicial de infecção;	(Ambrosi et al. 2015)
ospF	Promove a migração de células polimorfonucleadas, inflamação e proliferação celular;	(Zurawski et al. 2006, Arbibe et al. 2007)
ospC	Família de proteínas envolvida na modulação da resposta imunológica do hospedeiro;	(Zurawski et al. 2006)
ospE1 e ospE2	Induzem a adesão bacteriana na membrana celular;	(Faherty 2012)
Stx1	Shiga toxina que inibe a síntese proteica de células hospedeiras;	(Melton-Celsa 2014)
ShET1 e shET 2	Enterotoxinas relacionadas aos sintomas clínicos da shigelose;	(Fasano et al. 1995, Faherty et al. 2012)
VirA	Desestabiliza a formação de microtúbulos, favorecendo a motilidade baseada em actina;	(Yoshida et al. 2006)
Pic	Atua na clivagem da mucina;	(Henderson et al. 1999, Sperandio et al. 2013)

Este sistema é composto por cerca de 50 proteínas e é estruturado por três divisões principais, sendo elas: o complexo basal, agulha extracelular e o domínio de *translocon*, localizado na ponta do sistema de agulha. Este sistema possui uma sequência sinal na região N-terminal que pode ser compartilhado em outras espécies bacterianas, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia* spp. (Mota et al. 2005, Green, Erin R.; Mecsas 2016).

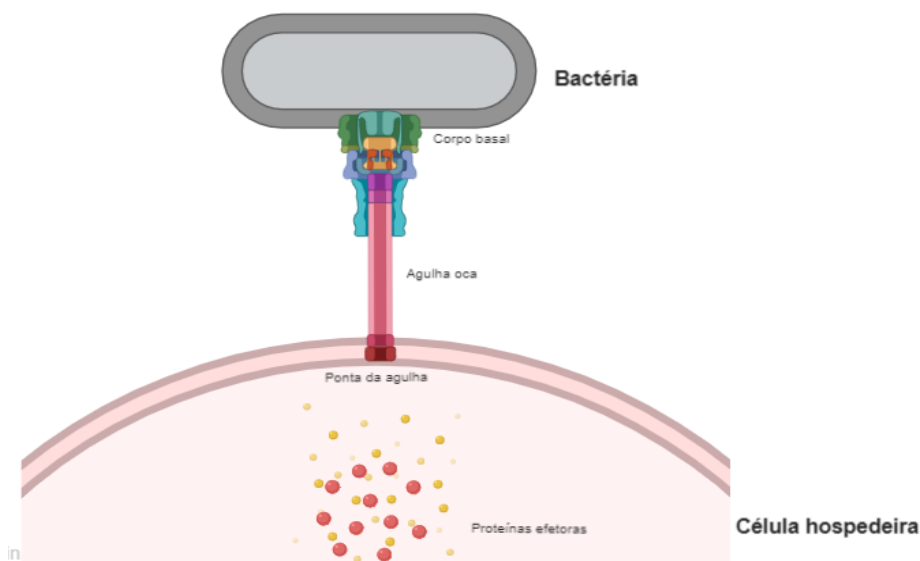


Figura 5: Representação esquemática do Sistema de Secreção do Tipo III (SST3).

O arranjo desse sistema é formado por três regiões principais, que são: a base, que está contida na membrana interna e externa da bactéria, a agulha, que é a estrutura oca cilíndrica localizada no espaço extracelular que permite a passagem de proteínas efetoras e a ponta da agulha, que entra em contato direto com a célula eucariótica, a fim de que as proteínas sejam entregues à célula hospedeira.

2.5.1.1. Ativação de SST3 através da indução por Vermelho Congo

O Vermelho Congo (VC) é uma substância utilizada em diversas áreas, como na microbiologia, para a diferenciação de cepas virulentas, para testes de hidrofobicidade e ainda como marcador de pH. Este corante possui a capacidade de mimetizar o contato celular bacteriano ao epitélio gastrointestinal do ser humano, se tornando uma alternativa experimental para testes de invasão, adesão e contato celular em estudos com as espécies de *Shigella* (Qadri et al. 1988, Chen et al. 2014).

Desde a década de oitenta, a literatura tem reportado testes *in vitro*, com o uso desta substância, para a investigação de efetores relacionados à patogênese da *Shigella* (Sankaran et al. 1989).

Estudos avaliando a ativação do SST3 têm utilizado o corante Vermelho Congo, como indutor para a atividade de SST3, mimetizando o contato das bactérias com células epiteliais (XINGMING et al., 2006).

Este sistema codifica fatores de virulência quando é submetido a uma condição de temperatura semelhante à temperatura corpórea do ser humano, que é por volta de 37°C, porém a secreção de proteínas efetoras só ocorre quando há o contato com células epiteliais ou quando é induzido através de mimetização celular por substâncias químicas como o Vermelho Congo (Parsot 2009, Marteyn et al. 2012, Mattock & Blocker 2017).

Tal corante, classificado como um azo sulfonado interage com a maquinaria celular da *Shigella* através de sua cadeia estrutural hidrofóbica na parte central e seus grupos carregados na extremidade da molécula (Bahrani et al. 1997).

Estudos de investigação do processo de adesão bacteriana ao epitélio intestinal também têm sido realizados em ensaios *in vitro* com a exposição ao Vermelho Congo, como o de Faherty e colaboradores (2012), que relatou o aumento de proteínas relacionadas à adesão celular de *Shigella* na presença de sais biliares, bem como estudo de Costa e colaboradores (2012) na identificação de novos efetores secretados juntamente com chaperonas.

Recentemente, este indutor químico foi considerado o mais eficiente para ativação e secreção de proteínas efetoras, a partir do SST3, em relação a outros compostos, como o Evans Blue (EB), e o Deoxycholate (DOC)(Liu et al. 2017).

2.6. Proteômica

A proteômica está inserida no conjunto das “ômicas”, que é definida como a ferramenta que permite a análise da diversidade de moléculas e que, juntamente com outras tecnologias desenvolvidas, possibilita o estudo de genomas completos, genes transcritos, proteínas, metabólitos, entre outros. As “ômicas” estão sendo aplicadas nas mais diferentes áreas, sendo categorizadas nos campos da: genômica, microbiômica, epigenômica, transcriptômica, metabolômica e da proteômica. Todas estas áreas estão relacionadas à compreensão de

inúmeras doenças, principalmente em seus mecanismos, tratamento e diagnóstico (Hasin et al. 2017).

O campo proteômico, propriamente dito, se baseia, em resumo, na identificação e quantificação de peptídeos e proteínas, codificados por um determinado organismo, através do uso de tecnologias e equipamentos automatizados, desenvolvidos especialmente para este fim. Além disso, é uma abordagem que se aplica a diversos organismos e ambientes, como por exemplo, em estudos de interações biológicas em comunidades microbianas e estudos entre a relação patógeno e hospedeiro, além de muitos estudos comparativos (Wang et al., 2016; Hasin; Seldin; Lusic, 2017).

Esta técnica permite a identificação de proteínas totais do organismo de interesse, sob condições apropriadas para o objetivo do estudo e fornece a base para diferentes aplicações, como o desenvolvimento de biomarcadores, novos alvos terapêuticos, vacinas e caracterização de vias metabólicas. Tais proteínas podem ser oriundas das mais diversas fontes, como tecidos, plasma, sangue, saliva, células e moléculas secretadas (Barbosa et al., 2012; Aslam et al., 2017).

Estudos proteômicos demandam tecnologias e softwares especializados, pois a complexidade dessas moléculas requer técnicas sensíveis e uma análise minuciosa, uma vez que os dados gerados são de alto volume. A geração e análise desses dados podem empregar uma ou mais técnicas, assim como o uso de diferentes softwares e programas e um banco de dados completo para a inferência de proteínas (Nesvizhskii & Aebersold 2005).

A análise do complexo proteico juntamente com as tecnologias de alto rendimento, também conhecidas como "*high-throughput*" dá acesso a uma infinidade de informações acerca da propriedade, função, estrutura e outras interações biológicas que este complexo pode apresentar, como por exemplo, modificações pós-traducionais, e interações do tipo proteína-proteína e proteína-ácido nucléico. Além disso, a estratégia de somar a proteômica a outra "ômica", como a genômica, têm sido de grande importância para solucionar a causa de muitas doenças, além de responder muitos outros questionamentos (Hasin et al. 2017).

A microbiologia tem sido uma área em crescente exploração pela proteômica, pois a diversidade organismos, principalmente de patógenos causadores de infecção, como bactérias, fungos e protozoários, contribui para a investigação de novas aplicações biotecnológicas, estudos de diferenciação de espécies, anotação de genes baseada no proteoma, alterações do proteoma e na morfologia bacteriana mediante a exposição de antibióticos (Armengaud 2013, Kucharova & Wiker 2014, Paauw et al. 2015, Ma et al. 2017).

2.6.1. Proteômica Bacteriana

É de conhecimento da comunidade científica que a compreensão de um proteoma é algo desafiador, como a própria definição já diz, ele consiste na totalidade de PROTeínas de um genOMA, célula ou tecido, como afirmou Wilkins, dado que o mesmo não é estático, podendo variar em sua composição de acordo com as condições fisiológicas e ambientais a que é exposto, ou seja, tem um perfil dinâmico. A constante mudança desse perfil contrasta como conteúdo do genoma, visto que o mesmo se caracteriza como algo pré-determinado, sem grandes modificações. Ademais, o proteoma facilita a comparação daquilo que está presente no genótipo com o que se observa no fenótipo, para futuras associações (Wilkins et al. 1996, Doherty & Whitfield 2011).

Diversos estudos têm investigado o papel do proteoma bacteriano frente a diversos estados fisiológicos e condições de crescimento, principalmente para bactérias patogênicas, que são responsáveis por graves problemas de saúde pública, devido à ocorrência de doenças infecciosas perigosas para os seres humanos, muitas sendo responsáveis por epidemias e causando até mesmo a morte (Horvatic et al. 2016).

Dentre as principais bactérias causadoras de infecções, podemos destacar as causadoras da diarreia, como a *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e enterohemorrágica (EHEC) (diarreiogênicas) e *Campylobacter* spp. No entanto, não há vacinas disponíveis para esses patógenos, embora diversas pesquisas estejam sendo desenvolvidas, inclusive

estratégias de vacinas com cepas atenuadas e proteínas potencialmente imunogênicas contra a *Shigella* spp. (O’Ryan et al. 2015).

Para que ocorra o processo de infecção, diversas moléculas e proteínas são utilizadas nas mais diferentes etapas, dependendo do microrganismo estudado. Tais proteínas presentes nesse conjunto, que é o proteoma, são utilizadas como mecanismos de ataque ao hospedeiro, participando dos processos de invasão, reconhecimento de receptores, colonização, disseminação, escape da resposta imunológica do hospedeiro e outras interações moleculares que facilitem a sua atividade (Martinez-Martin 2017).

Segundo Becke colaboradores (2011), a compreensão do proteoma deve ser de forma abrangente, ou seja, na sua totalidade, para que haja uma comparação fidedigna daquilo que se deseja. Devendo levar em consideração muitos parâmetros, para uma completa cobertura do proteoma, como as técnicas experimentais de preparação da amostra e a identificação correta no banco de dados.

A identificação do proteoma é baseada no conteúdo codificado pelo genoma e embora este conteúdo seja dinâmico, pode estar aliado a técnicas genômicas como método de caracterização microbiana. Além disso, a abordagem proteômica tem sido visada como uma “nova genômica”, como forma de caracterização completa de sistemas biológicos (Cox & Mann 2007, Karlsson et al. 2015).

2.6.1.1. Proteínas extracelulares - Exoproteoma Bacteriano

Diferentes terminologias são empregadas quando se refere ao conteúdo de proteínas que são liberadas pelas bactérias, sejam elas Gram-negativas ou Gram-positivas, uma vez que, as proteínas secretadas podem ser tanto encontradas no meio extracelular, quanto na parede bacteriana externa. Portanto, o exoproteoma do conteúdo extracelular, se refere somente as proteínas presentes no meio extracelular, mais especificamente no meio de cultura utilizado no crescimento bacteriano, ou seja, a produção proteica encontrada no sobrenadante (Desvaux et al. 2009, Christie-Oleza & Armengaud 2010).

Diversos estudos utilizam o conteúdo proteico presente no sobrenadante bacteriano para detecção de uma ou mais proteínas em uma ou diferentes fases de crescimento (Snider et al. 2016). Além disso, estudos comparativos do proteoma extracelular, além de intracelular, também têm sido empregados na compreensão de associações daquilo que está presente no genoma com os diferentes fenótipos de virulência bacteriano observados (Bonar et al. 2016).

A gama de proteínas secretadas por bactérias patogênicas estão envolvidas nas mais diversas funções celulares, principalmente na injeção de fatores de virulência, que são fatores capazes de destruir a integridade das células infectadas, afetando assim a sua funcionalidade (Green, Erin R.; Mecsas 2016, Maffei et al. 2017).

Cabrita e colaboradores (2014) destacam a importância de que estudos comparativos de proteínas secretadas por cepas com diferentes perfis de virulência podem auxiliar na identificação de novos efetores, assim como novos alvos potencialmente interessantes, como marcadores de cepas virulentas.

Diferentes metodologias são aplicadas para a identificação dessas proteínas, incluindo a estratégia de fracionamento direto, que é a centrifugação do meio de cultura bacteriano para isolamento das proteínas presentes na suspensão (Maffei et al. 2017).

2.7. Proteínas intracelulares

Assim como as proteínas extracelulares, as proteínas intracelulares do patógeno também são elementares, principalmente no funcionamento do metabolismo e na estruturação de unidades transportadoras, como é o caso das proteínas presentes no citoplasma, uma vez que as mesmas são sintetizadas nesta região e posteriormente são encaminhadas ao ambiente membranar, como é o caso das OMPs (*Outer Membrane Proteins*) (Poetsch & Wolters 2008, Wang et al. 2016).

Tanto o ambiente citoplasmático como o de membrana interna comportam proteínas que participam de diferentes processos celulares do patógeno,

contribuindo em atividades como: sua adaptação ao tecido epitelial do intestino do hospedeiro, equilíbrio do metabolismo bacteriano, participação de proteínas atuantes nas vias de respiração, fontes de carbono e fermentação, e ainda no estresse celular, transcrição e mecanismos relacionados à patogenicidade (Pieper et al. 2013, Liu et al. 2015).

Ademais, tais proteínas exercem interações com outras proteínas, tanto do seu próprio conjunto, como do hospedeiro, propiciando a sobrevivência do patógeno em decorrência dos ataques de respostas imunológicas (Suh et al. 2014).

A identificação destas é feita através da lise bacteriana, ou seja, apenas o sedimento bacteriano é analisado, assim, o conteúdo proteico a ser detectado pode estar presente tanto no conteúdo citoplasmático, como nas membranas celulares (Wang et al. 2016).

2.8. Ferramentas Proteômicas

As tecnologias desenvolvidas para a separação e identificação de proteínas estão cada vez mais evoluindo, com técnicas que vão da separação de proteínas por SDS –PAGE, que é baseada em eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE) com uso do detergente de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), de uma ou duas dimensões (1D e 2D) ao método “*gel-free*”, com o uso da cromatografia até a análise pela técnica de Espectrometria de Massas (MS), que é uma técnica que tem sido aprimorada desde o final da década de 80 com aplicação na identificação de misturas mais complexas, incluindo as proteínas (VerBerkmoes et al. 2004, Barbosa et al. 2012).

A digestão de proteínas em peptídeos para posterior análise em Espectrometria de Massas é classificada com uma abordagem “*bottom-up*”, ou seja, a partir da análise de fragmentos de uma amostra complexa de proteínas (VerBerkmoes et al. 2004). Esta técnica é amplamente utilizada, sendo uma das mais comuns para a identificação de proteínas (Arsène-Ploetze et al. 2015).

Em resumo, alguns passos são necessários para que as metodologias proteômicas sejam empregadas, como a obtenção das proteínas da amostra de interesse, a separação do conglomerado proteico, o fracionamento das proteínas em peptídeos, a ionização e identificação associada à análise bioinformática (Barbosa et al. 2012).

Em todos esses processos, algumas características são primordiais para que a identificação seja precisa, sendo elas a reprodutibilidade, disponibilidade de sequências depositadas nos bancos de dados, sensibilidade, acurácia e alta resolução dos equipamentos (Wang et al. 2016b, Aslam et al. 2017).

2.8.1. Eletroforese Unidimensional e Espectrometria de Massas

A abordagem de separação de proteínas utilizando gel de poliacrilamida unidimensional tem sido reportada na literatura por diversos estudos, tendo como vantagem sua simplicidade em relação ao gel bidimensional, uma vez que esta abordagem não necessita de focalização isoelétrica, e seu objetivo principal é a separação baseada na massa molecular. Embora a técnica possua limitações, seu uso pode ser acoplado a técnicas cromatográficas, permitindo uma maior resolução (Poetsch & Wolters 2008, Barbosa et al. 2012).

A separação de proteínas através da eletroforese seguida pela identificação de Espectrometria de Massa acoplada à Cromatografia Líquida (LC-MS), que também pode ser definida como “*sort-then-break*” (Karlsson et al. 2015). Essa estratégia facilita o uso de espectrômetros de massa que utilizem a ionização por Eletrospray (ESI) (Figura 6), pois essa fonte de ionização atinge peptídeos envoltos em soluções líquidas que são dispersas semelhante a um spray, formando aerossóis até que a solução seja totalmente evaporada e então seja feita a análise pela MS dos íons carregados (Banerjee & Mazumdar 2012, Intelicato-Young & Fox 2013).

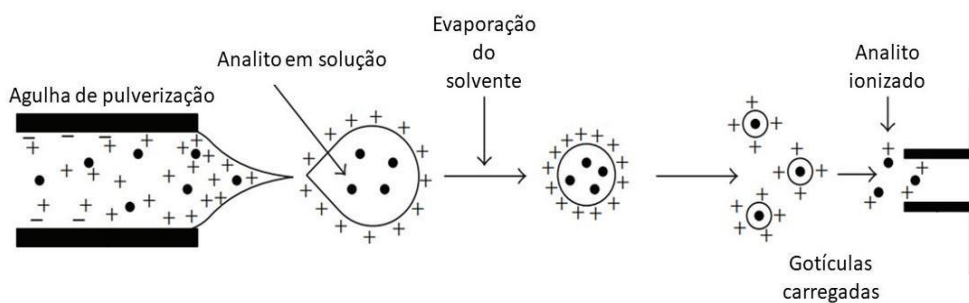


Figura 6: Representação esquemática do Sistema de Ionização por Electro spray (ESI).

Este sistema é baseado na ionização de moléculas em solução, que ao entrar em contato com uma fonte de energia ionizável, promove a evaporação de tal solução, provocando a formação de gotículas semelhante a um spray. Conforme a dispersão da solução ocorre, somente os analitos ionizados serão captados e detectados para posterior identificação. Fonte: Adaptado de Banerjee (2012).

Este tipo de ionização é considerado suave, uma vez que gera pouca fragmentação dos analitos, que são as partículas alvos da ionização. Após a ionização, os fragmentados são detectados e analisados de acordo com sua relação de massa/carga (m/z) (Aebersold, Ruedi; Goodlett 2001).

Os íons gerados a partir dessa fragmentação inicial, denominados como íons precursores, podem ser analisados novamente, ou seja, gerando uma análise de MS sucessiva, mais conhecido como a abordagem MS/MS (Espectrometria de massa em tandem). A análise da massa é o passo fundamental para a detecção dos íons com diferentes tipos de massas e cargas (Banerjee & Mazumdar 2012).

Para a análise em *tandem*, diversos analisadores podem ser empregados, como o tipo Quadrupolo com Tempo de Vôo (Q-TOF) (Bodnar et al. 2003, Ho et al. 2003). Este tipo de analisador, oferece uma boa resolução, uma acurácia na ordem de 2 a 5 ppm e uma rápida velocidade de escaneamento, além do aumento da sua eficiência em análises em *tandem* (Gouveia et al. 2014, Karlsson et al. 2015).

A alta sensibilidade e especificidade da técnica de MS promovem a detecção de analitos com diferentes pesos moleculares, além de dispensar o uso de matrizes, esta técnica permite a identificação de diferentes moléculas, que podem ser oriundas de amostras biológicas, como proteínas e peptídeos, em quantidades mínimas (Ho et al. 2003, Gouveia et al. 2014).

Em síntese, o fluxo de atividades em metodologias proteômicas que empregam o uso de gel e a espectrometria de massas para a identificação de proteínas está dividido em algumas etapas principais (Figura 7), como a extração de proteínas da amostra de interesse, separação por eletroforese unidimensional em SDS-PAGE, excisão e digestão de bandas de proteínas, seguindo para a identificação de peptídeos por Espectrometria de Massas, que pode ser acoplada à Cromatografia Líquida e, por fim, a análise de dados obtidos (Arsène-Ploetze et al. 2015).

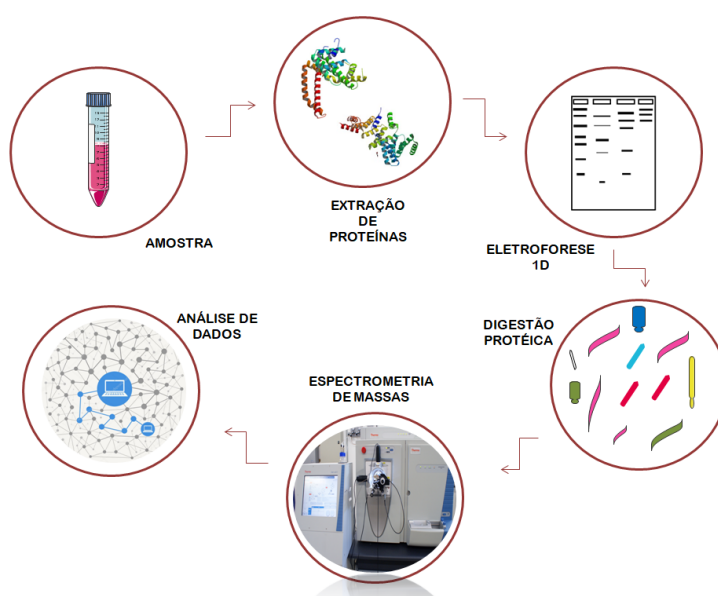


Figura 7: Fluxo de trabalho empregado em técnicas proteômicas.

Para a identificação de proteínas que utilizam a metodologia baseada em SDS-PAGE de uma dimensão é necessário inicialmente a seleção da amostra de interesse, seja ela de origem vegetal, animal ou bacteriana, a escolha do protocolo de extração de proteína mais eficiente para posterior separação proteica em eletroforese 1D e em seguida fragmentação das proteínas em peptídeos para sua detecção através da MS e por fim a obtenção e análise de dados.

3. Justificativa

A doença causada pela *Shigella* ainda é um grave problema de saúde pública, levando a óbito milhões de pessoas, principalmente crianças em países em desenvolvimento, onde as condições de saneamento básico e de acesso à saúde são precárias, tornando-se preocupante os casos de recorrência dessa infecção.

Embora hajam esforços das organizações sem fins lucrativos no combate a esta doença, bem como estudos visando o desenvolvimento de vacinas e melhoramento dos diagnósticos, as complicações geradas por esta patologia tem causado danos em longo prazo devido aos constantes quadros de shigelose, prejudicando até mesmo o desenvolvimento e a capacidade de aprendizagem das crianças, que são as mais afetadas.

Diante deste cenário se faz necessário compreender a patogênese da shigelose nos seus mais diferentes aspectos, com destaque para a identificação de proteínas efetoras, que é um dos principais mecanismos ativados por esta bactéria para seu estabelecimento no hospedeiro. Dessa forma, a abordagem proteômica permite explorar as proteínas oriundas de cepas circulantes, trazendo luz aos estudos, uma vez que não há vacina efetiva contra a shigelose.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Identificar o perfil de proteínas extra e intracelulares relacionadas à virulência da cepa clínica de *Shigella flexneri* strain 201.

4.2. Objetivos Específicos

- Obter os perfis de crescimento da cepa clínica e de referência de *Shigella flexneri*;
- Identificar as proteínas extracelulares e intracelulares em cepas expostas e não expostas ao Vermelho Congo;
- Analisar as proteínas diferenciais entre as cepas;
- Mapear potenciais rotas metabólicas utilizadas pela cepa clínica no processo de patogenicidade;

5. Material e Métodos

5.1. Fluxograma de trabalho

O etapas do projeto (Figura 8) mostra as principais atividades executadas na pesquisa, as quais são: Cultivo bacteriano, extração de proteínas, seguido da digestão trípica e obtenção de dados do material submetido à Espectrometria de Massas e análise de dados, que permite as comparações proteômicas entre as cepas e condições de crescimento.

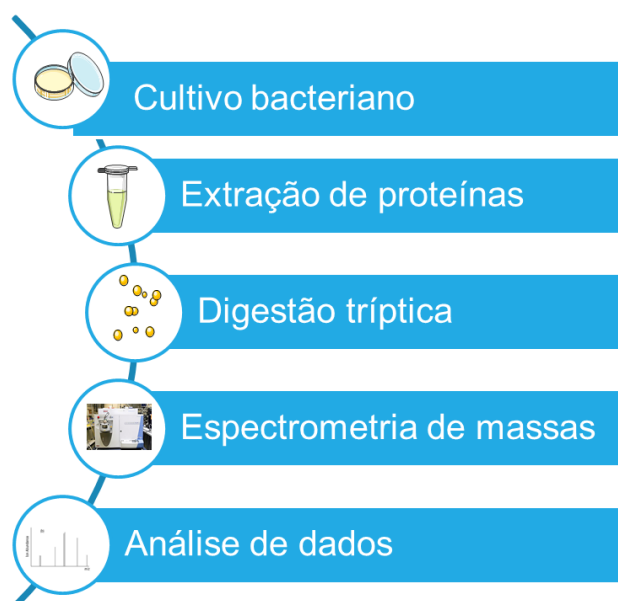


Figura 8: Principais atividades do projeto.

As etapas incluem a fase de cultivo bacteriano, extração de proteínas, digestão trípica, submissão de amostras à espectrometria de massas e análise de dados.

5.2. Reativação das cepas e condições de crescimento bacteriano

No estudo, foram utilizadas duas cepas *Shigella flexneri*, sendo uma cepa clínica com alta capacidade invasiva, isolada e caracterizada em estudos anteriores e, denominada como *Shigella flexneri* strain 201 (Serra 2013, Cruz et al. 2014, Dantas 2016, Verçosa, 2018), e a cepa de padrão *Shigella flexneri* 5a M90T, utilizada como referência em diversos estudos com esta espécie.

Tabela 2: Características da cepa clínica em estudo.

	Idade	Sexo	Local e data da coleta	Sintomas	Co-infecção	Consumo de água
<i>Shigella flexneri</i> str.201	3 meses	M	Pronto Socorro da Criança - Zona Sul (30/10/2007)	Diarreia, febre e desidratação.	<i>Shigella</i> como único agente	Poço artesiano

As cepas armazenadas em glicerol 60% foram reativadas em tubos com 3 mL de caldo Lúria-Bertani (LB) ajustado ao pH de 7,0 sob agitação constante a 37°C pelo período de 24 horas. Após o crescimento, a Densidade Óptica (D.O) foi mensurada através da leitura em espectrofotômetro (Biochrom), com leitura na faixa de 600 nm de absorbância.

Em seguida, cada inóculo foi transferido para 50 ml de meio de cultura LB com e sem adição do mimetizador químico de Vermelho congo para a realização da curva de crescimento bacteriano.

5.3. Curva de crescimento bacteriano

Tanto a cepa de referência *Shigella flexneri* 5a M90T como a cepa clínica *S. flexneri* str.201 foram cultivadas com e sem a presença de VC. O preparo do meio VC foi feito a uma concentração final de 0,01% do indutor químico.

A curva de crescimento bacteriano foi realizada com duas replicatas biológicas e em triplicata técnica.

O inóculo de $1,5 \times 10^8$ de cultura bacteriana foi distribuído em Erlenmeyers contendo caldo LB e caldo VC, cada um com 50 ml de cultura, sendo mantidos sob as mesmas condições de reativação bacteriana, com exceção do tempo (h). A seguir a $D.O_{600nm}$ foi mensurada em intervalos de 1h até que a fase de declínio tenha sido alcançada.

Para a escolha do ponto de coleta na fase logarítmica, para extração de proteínas, o gráfico obtido com as fases de latência, exponencial, estacionária e declínio foram analisados.

5.4. Extração Proteica – Ambiente extracelular

Após a definição das fases de latência, exponencial, estacionária e declínio, as cepas foram cultivadas sob as mesmas condições realizadas na curva de crescimento até a sua fase exponencial.

Após o crescimento, o cultivo bacteriano de 50 mL, apenas da cepa clínica de *S.flexneri* str.201, foi centrifugado a 3000 xg por 10 minutos a 20°C, logo após, o sobrenadante da cultura foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 µm de porosidade (*Millipore*) para retenção das células bacterianas.

5.5. Extração Proteica – Ambiente intracelular

Para a extração intracelular de proteínas, a cepa de referência *Shigella flexneri* 5a M90T e a cepa clínica de *S.flexneri* str.201 foram cultivadas sob as mesmas condições já citadas e em seguida foram centrifugadas a 2727 xg, a 4°C, por 30 minutos. A seguir o sedimento formado foi ressuscitado em 3 mL de tampão Tris-HCl 50mM com pH 7,5, centrifugado novamente a 2727 xg, a 4°C por 15 minutos.

Após a lavagem, as células foram ressuscitadas com 1mL de tampão de lise (7M ureia, 2M tioureia e 4% CHAPS, 50 mM DTT) e 1 mM de inibidor de serino e cisteíno proteases – FTPMSF(*phenyl methane sulfonyl fluoride*).

Para a lise celular, as amostras foram sonicadas em banho de gelo durante três ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos entre cada ciclo.

Seguido da lise, as amostras foram incubadas durante 30 minutos no gelo e em seguida, centrifugadas por 30 minutos a 14462 xg, a 4°C.

O sobrenadante obtido foi distribuído em volumes de 100µL em microtubos de 1,5mL, com adição de 5V de solução gelada de metanol.

Posteriormente, os tubos foram agitados em vórtex durante 30 segundos e centrifugados por 15 minutos, a 14462 xg, a 4°C, e em seguida o sobrenadante foi descartado.

O sedimento formado foi ressuspensão com 1mL de metanol e centrifugado novamente por 15 minutos, a 14462 xg, a 4°C.

A lavagem com metanol deverá ser feita por 2 vezes e por fim, o sedimento final foi seco à temperatura ambiente, sendo armazenado a -20°C até a hora do uso.

5.6. Precipitação e dosagem de proteínas

A precipitação de proteínas extraídas do ambiente extracelular seguirá o protocolo de Ácido Tricloroacético (TCA) (Sanchez 2001).

Para este protocolo, 1 volume (1V) da solução de TCA foi adicionado a 4 volumes (4V) de amostra de proteína e em seguida, foi incubado a 4°C por 10 minutos. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 14462 xg por 5 minutos e o sobrenadante descartado, apenas permanecendo um sedimento de aspecto esbranquiçado.

Após a formação do sedimento, o mesmo foi ressuspensão com 200µl de acetona fria e em seguida centrifugado a 14462 xg por 5 minutos, com repetição deste passo por mais uma vez, totalizando duas ressuspensões com acetona.

Logo após a ressuspensão, o excesso de acetona foi removido e o microtubo contendo o sedimento, incubado em bloco térmico a 95°C de 5 a 10 minutos para que haja a evaporação da acetona.

Sucessivamente, a dosagem de proteínas tanto extra como intracelulares, para posterior análise em gel SDS-PAGE 1D foi realizada por meio do kit de quantificação 2-D Quant Kit (*GE Healthcare*), de acordo com as instruções do fabricante.

5.7. Análise eletroforética unidimensional

Para análise da qualidade do perfil eletroforético das proteínas extraídas, procedeu-se à eletroforese de uma dimensão, o SDS (*Dodecil sulfato de sódio*)–PAGE (*Polyacrylamide gel electrophoresis*).

A massa de proteínas, previamente quantificada, foi solubilizada em 100µL de Tampão desnaturante (0,2 M de Tris-HCl, pH 6.8 a 4% (v/v); SDS/a 4% (v/v) β-Mercaptoetanol a 20% (v/v); glicerol a 0,1% (p/v) e azul de bromofenol), e a seguir, a solução foi incubada a 100°C em banho de água por 5 minutos.

Após esta etapa, as concentrações de 5, 10 e 15µg de proteínas de cada amostra foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12%), embebido em tampão Tris-Glicina 1x com pH 8.3 (0,025 M de Tris; 0,192 M de Glicina e SDS a 0,1%) com voltagem elétrica de tensão máxima de 500V a uma corrente elétrica de 25 mA no início do experimento, para empacotamento das amostras e posteriormente a 50mA, para separação das proteínas no gel separador. O equipamento utilizado foi o Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad).

Após a corrida de eletroforese, as proteínas foram fixadas no gel por 30 minutos em solução fixadora (10% (v/v) de ácido acético; 40% (v/v) de metanol), seguido de coloração com azul de Coomassie R-250 *overnight* e descolorado com solução descolorante (etanol 25% e ácido acético 8%) e água deionizada.

A seguir, o gel foi digitalizado utilizando o programa LabScam 5.0.

A partir da obtenção do perfil unidimensional de cada condição, as faixas de proteínas foram selecionadas, atentando-se para isolar faixas com proteínas abundantes das demais. Após a seleção dessas faixas, as proteínas foram excisadas do gel e submetidas aos protocolos de digestão *in gel*.

5.8. Proteólise *in gel* e para submissão à ESI-LC-MS / MS

Após a análise eletroforética de proteínas, as bandas foram excisadas, para proteólise *in gel* conforme o protocolo de Shevchenko e colaboradores 1996,

(modificado), que consiste na excisão das bandas de proteínas em pedaços de aproximadamente 1 mm, que foram descoradas com 0,5mL da solução 1 (destain) e incubadas por 1h à temperatura ambiente, com repetição deste passo por mais 2 vezes (totalizando 3 horas, trocando a solução de descorante em cada passo).

Após o descarte da solução descorante, as bandas de gel foram desidratadas com adição de 200 μ L de acetonitrila (100%) por 5 minutos e em seguida a solução foi removida para repetição deste passo. Após a remoção da acetonitrila, os resíduos da mesma foram evaporados. Após este passo, as amostras foram submetidas à redução proteica com a adição de 30 μ L da solução de Ditioneitol (DTT) a 10 mM com incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Passado o período de incubação, a solução de DTT foi removida e em seguida, as amostras foram submetidas à alquilação com adição de 30 μ L da solução de Iodoacetamida (IAA) a 50 mM com incubação por 30 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz.

A seguir, a solução de IAA foi removida e posteriormente foi feita a lavagem das bandas de gel com adição de 100 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM em cada amostra por 10 minutos, seguido da remoção desta solução. Novamente as amostras foram submetidas à etapa de desidratação, adicionando 200 μ L de acetonitrila (100%) com incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida removendo a acetonitrila. Posteriormente, realizou-se a reidratação das bandas de gel com adição de 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos e em seguida removeu-se esta solução para que a etapa de desidratação fosse repetida por mais duas vezes.

Ao final das etapas de desidratação, removeu-se completamente a acetonitrila por evaporação para que a tripsinização das proteínas fosse realizada.

Para a digestão de proteínas em peptídeos, foi adicionada de 30-50 μ L da solução de tripsina, na concentração final de 20 ng/ μ L, com incubação da solução por 30 minutos em banho de gelo. Após a incubação, procedeu-se a um spin rápido seguido pela remoção do excesso de solução de tripsina. Após esta etapa, adicionou-se de 5 a 20 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM, ou seja, uma

quantidade suficiente para cobrir a banda de gel, deixando a solução a 37°C, *overnight*.

Para a extração peptídica foi adicionado 10 µL da solução 1 de extração (ácido fórmico 5%) nas amostras de banda de gel, com incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de um *spin* rápido e transferência da solução sobrenadante para outro tubo previamente separado.

Dando continuidade à extração peptídica, adicionou-se 12 µL da solução 2 de extração (ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%) nas amostras de bandas de gel, com incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de um *spin* rápido e transferência do sobrenadante para o tubo que fora previamente separado (já contendo o extrato do passo anterior). O passo foi repetido e a amostra coletada foi evaporada até conter aproximadamente 1 µL de solução e então foi armazenada a -20°C, até o momento de análise no equipamento.

Para a análise em MS, as amostras foram recuperadas com 10 µL de ácido fórmico 0,1% e aplicadas em *vials*, no qual uma alíquota de 2,5 µL da mistura de peptídeos foi separada em uma coluna cromatográfica de Carbono 18 (C18) (75µm x 100 mm) *Reversed-Phase Ultra Performance Liquid Chromatography* (RP-nano UPLC) (nanoAcquity, WATERS) acoplado a um espectrômetro de massas modelo Q-TOF Ultima (WATERS Micromass) com fonte de ionização nano-electrospray a uma taxa de fluxo de 0,6µL/min. O gradiente utilizado foi de 2% a 90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico com tempo de corrida de 20 min. O instrumento foi operado no modo top three, onde um espectro de MS é adquirido seguido por fragmentação MS/MS dos 3 primeiros picos mais intensos.

Os espectros obtidos foram processados utilizando o software *MascotDistiller 2.2.1.0*, 2008 *Matrix Science* (MassLynx V4.1) e comparados com o banco de dados de *Shigella* spp. (UNIPROT). Para as buscas, o software foi programado utilizando como modificações fixas a carbamidometilação, como modificação variável a oxidação da metionina, permissão de até uma clivagem de tripsina perdida e uma tolerância de 0,1 Da para precursor de fragmentos e íons.

Todas essas análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas e Workstation localizada no Laboratório Nacional de Biociências – LNBio (Campinas - SP), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), sob coordenação da Dra. Adriana Franco Paes Lemes, com supervisão da Dra. Bianca Alves Pauletti e MSc. Romênia Ramos Domingues.

5.9. Análises de bioinformática

5.9.1 Localização celular

Para a predição da localização celular das proteínas, foi utilizado o banco de dados do UNIPROT juntamente com o auxílio do software *Protein Subcellular Localization Prediction Tool* -PSORTdb na versão 3.0.2 (Yu et al. 2010), a partir do formato FASTA das proteínas identificadas.

Os critérios utilizados no software foram o tipo de organismo: Bactéria e a coloração de GRAM: Negativa.

As categorias inferidas se dividem em: citoplasma, membrana citoplasmática, membrana extracelular, periplasma, extracelular e proteínas não localizadas. Embora categorizadas, muitas proteínas estão presentes em mais de um ambiente celular, segundo a predição realizada. O parâmetro utilizado para categorização das proteínas foi o de maior porcentagem do local de predição.

5.9.2 Diagramas de comparação

Com o objetivo de conhecer tanto as diferenças quanto as semelhanças dos conjuntos de proteínas identificadas, realizou-se análise de dados através da construção de diagramas de Venn.

Os diagramas de Venn têm sido amplamente utilizados para comparação de grandes volumes de dados, como genes e proteínas. É possível encontrar

programas gratuitos que disponibilizam esta análise de dados, como o *InteractiVenn*, disponível em <<http://www.interactivenn.net/>>(Heberle et al. 2015).

Esta ferramenta permite a comparação de dados em uma interface acessível e dinâmica, seu uso facilitou a exploração de dados comparativos em ambas as condições à exploração de dados comparativos em ambas as condições experimentais, sob indução e não indução de Vermelho Congo, assim como a comparação de proteínas entre as cepas estudadas.

5.9.3 Redes biológicas

Além de dados essenciais como a localização, função e comparações do perfil de proteínas, o estudo das suas interações biológicas é capaz de prever uma conexão abrangente de como estas interagem, além de facilitar o rastreamento de potenciais alvos terapêuticos (Naz et al. 2015).

As interações estabelecidas podem auxiliar na predição de vias metabólicas vias regulatórias, mapear proteínas virulentas, dentre outras relações. Além da interação, a integração de dados como função, estrutura tridimensional e publicações relacionadas a estas redes compõem um arsenal de recursos que funcionais a cerca dessa rede biológica (Szklarczyk et al. 2011).

A predição de interação entre as proteínas foi feita através da ferramenta computacional *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes* (STRING), disponível em <<https://string-db.org/>>. Este recurso apresenta uma interface interativa e de fácil manuseio, além de estar integrado a fontes de dados como o UniProt, *Protein Data Base* (PDB), *Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes* (KEGG), *SwissModel*, *RefSeq* e *Ensembl* oferecendo assim uma análise mais completa de associação funcional e biológica (Szklarczyk et al. 2011).

As proteínas identificadas neste trabalho foram comparadas ao banco de dados de *Escherichia coli* dentro da própria ferramenta, pois este organismo possui seu genoma e proteoma mais explorado na atualidade, além de maiores informações disponíveis, oferecendo assim um maior número de interações potenciais devido a sua semelhança a espécie de *S.flexneri*.

5.9.4 Classificação biológica

A classificação de proteínas identificadas requer análises de grandes fluxos de dados, necessitando de ferramentas de alto rendimento, como o *Panther Data Base Classification System* (Panther DB), disponível em <<http://www.pantherdb.org/>>.

Esta ferramenta conduz a classificação de famílias e subfamílias a partir de modelos estatísticos e anotação de sequências para que as funções moleculares e processos biológicos sejam definidos (Thomas et al. 2003). O software está em constante atualização e conta com o depósito de 131 genomas completos, no entanto, não há sequências referentes ao gênero de *Shigella*, deste modo, as análises foram preditas através do banco de dados de *Escherichia coli* (Mi et al. 2019).

5.9.5 Predição de proteínas patogênicas

Identificar a porção de proteínas patogênicas em um determinado microrganismo tem sido relevante, principalmente para aprofundar os conhecimentos quanto à sua patogênese, além de contribuir para a caracterização deste microrganismo. Apesar desta relevância, estimar o número dessas proteínas ainda é um desafio, uma vez que, nem todas as proteínas identificadas estão anotadas ou tem sua função completa descrita nos bancos de dados (Gupta et al. 2014, Karlsson et al. 2015, Shahbaaz et al. 2016).

A abordagem para a identificação desta classe de proteínas é baseada na bioinformática, através de programas e softwares que possibilitam esta tarefa. Um exemplo é o software *Predict Pathogenic Proteins in Metagenomic Datasets* (MP3), que além de oferecer alta sensibilidade e especificidade, tem precisão e rapidez na análise de dados, além de estar disponível para uso público (Gupta et al. 2014).

A validação do desempenho desta ferramenta foi testada com proteínas oriundas de diferentes microrganismos, incluindo *Shigella flexneri*. Para o presente estudo, esta ferramenta foi utilizada para estimar a quantidade de proteínas patogênicas presentes tanto na cepa de referência, como na cepa clínica de *S. flexneri*.

Ambas as condições de indução e não induções foram submetidas a esta avaliação, com os seguintes parâmetros selecionados: threshold score: -0,2, que configura uma sensibilidade de 82,53 %, especificidade de 86,97 % e precisão de 86,02 %.

6. Resultados e Discussão

6.1. *Shigella flexneri* str.201 apresenta crescimento similar em meios LB e VC.

A figura 9 apresenta o perfil de crescimento bacteriano para a cepa de referência M90T) como para a cepa clínica str.201. As fases de crescimento bacteriano foram definidas até período de 35 horas, onde já era observado um período de fase de declínio constante nas cepas, com destaque para a cepa clínica, que apresentou taxa significativa (p -valor: 0.0052) de declínio na presença do mimetizador celular VC em relação à ausência do mesmo.

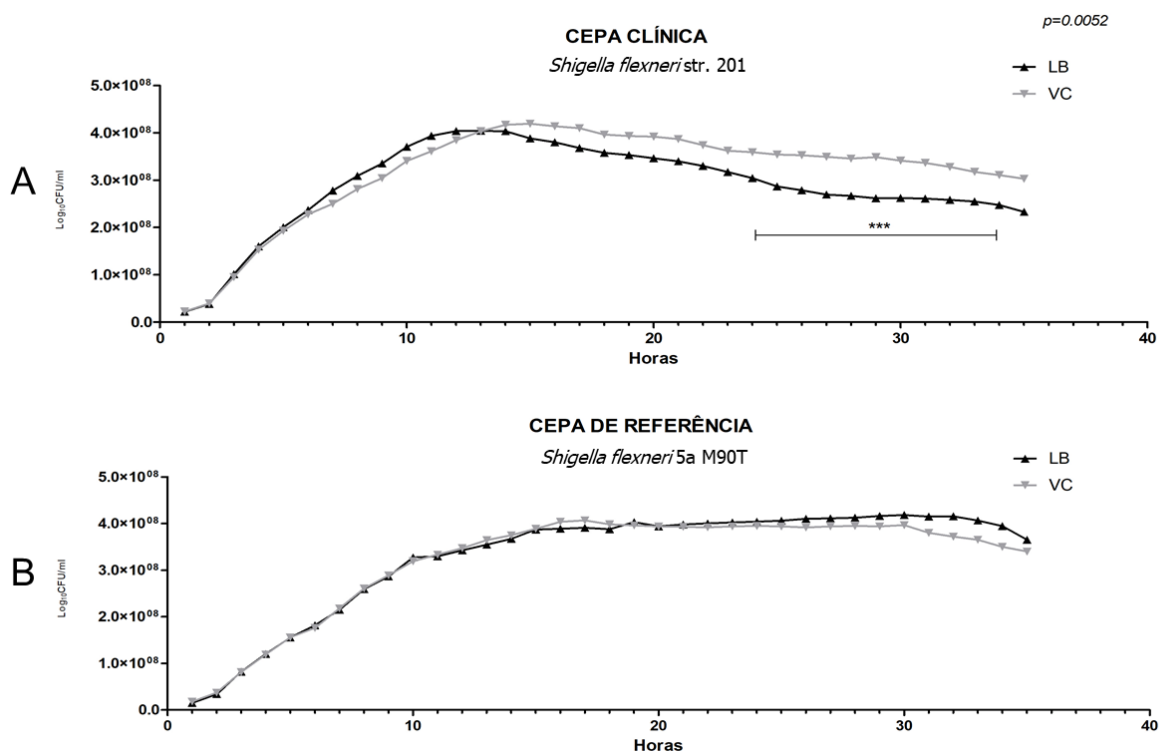


Figura 9: *Shigella flexneri* cepa str.201 apresenta crescimento similar em meios LB e VC.

Curva de crescimento bacteriano: (A) A cepa clínica e a (B) cepa de referência foram monitoradas durante 35 horas para determinação das fases de crescimento exponencial, estacionário e declínio, ambas sob indução e não indução de Vermelho Congo.

A cultura crescida até 10h foi coletada e submetida aos procedimentos de extração proteica, visto que representava a fase exponencial do crescimento, antes da bactéria iniciar a fase de desaceleração do crescimento para entrar na fase estacionária. Os experimentos foram realizados em replicata biológica e triplicata técnica.

A fase exponencial é caracterizada pela população celular definida em um estado fisiológico e pode ser facilmente reproduzida em condições laboratoriais. É uma fase utilizada em estudos de fisiologia e bioquímica de microrganismos, além de pesquisas relacionadas à susceptibilidade e patogênese (Barer 2014).

6.2. Perfil proteômico da cepa clínica e da cepa selvagem por análise eletroforética em 1-D.

Após o protocolo de extração, as proteínas intracelulares e extracelulares foram precipitadas e submetidas à dosagem (Tabela 3).

Tabela 3: Dosagem de proteínas intracelulares e extracelulares das cepas utilizadas no estudo.

Quantificação de proteínas em ug/uL.

Proteínas intracelulares (ug/uL)		
Cepas	Meio LB	Meio VC
<i>S.flexneri</i> str.201	24,7	3,19
<i>S.flexneri</i> 5a M90T	23,65	2,86
Proteínas extracelulares (ug/uL)		
Cepa	Meio LB	Meio VC
<i>S.flexneri</i> str.201	25,11	3

Para a análise eletroforética, foram aplicados 10 µg do extrato extracelular e 5 µg do extrato intracelular. Identificou-se a presença de proteínas em ambas as condições, mesmo o perfil de proteínas intracelulares e extracelulares sob indução de Vermelho Congo apresentando menor concentração de extrato protéico.

Ao total, 13 e 9 pares de bandas das condições de LB e VC da fração extracelular, respectivamente, foram excisados e digeridos para análise em MS (figura 10). Para a fração intracelular da cepa clínica, foram excisados 13 pares de ambas as condições (figura 11) e para a cepa de referência foram excisado 12 pares para condição de LB e 13 para condição de VC (figura 12).

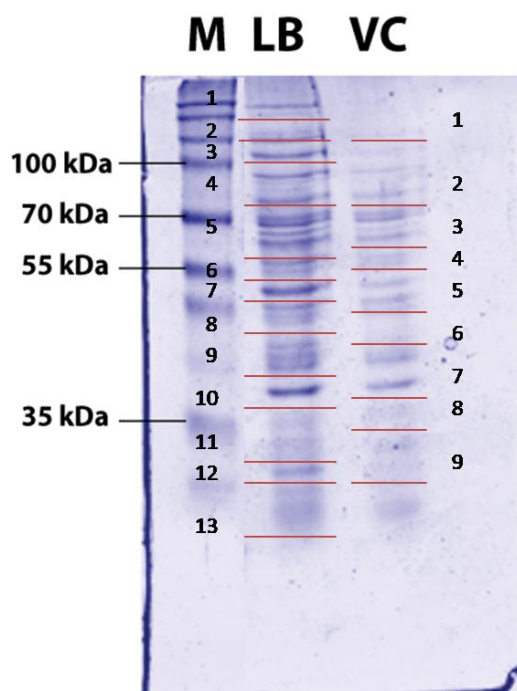


Figura 10: Faixas selecionadas para excisão de bandas de proteínas extracelulares da cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201 em gel unidimensional.

13 faixas de bandas de proteínas de interesse foram selecionadas para a cepa em meio LB e 9 faixas de bandas de proteínas de interesse foram selecionadas para a cepa induzida com VC. M: Marcador, LB: meio Lúria-Bertani, VC: meio Vermelho Congo.

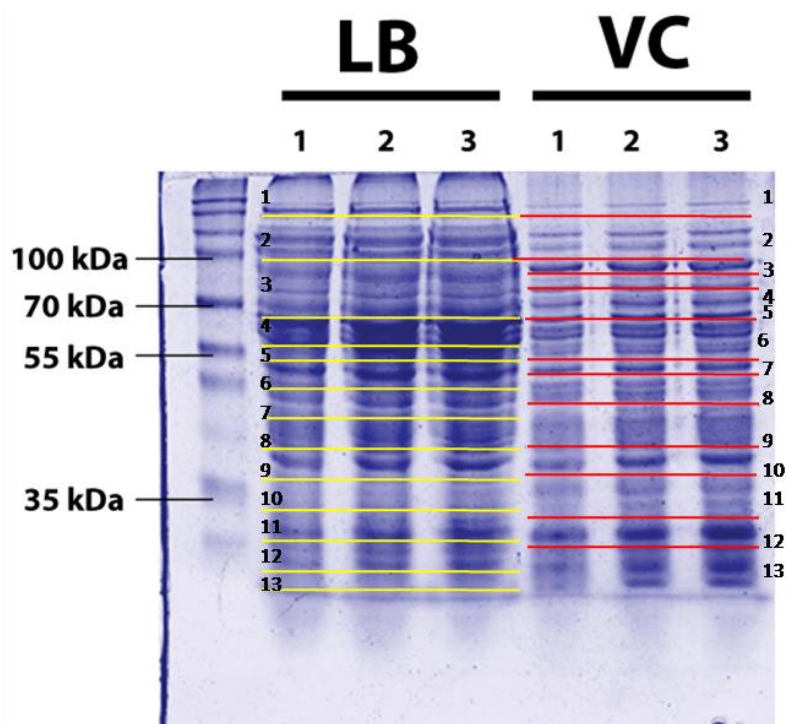


Figura 11: Faixas selecionadas para excisão de bandas de proteínas intracelulares da cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201 em gel unidimensional, com suas triplicatas.

Ao total, 13 pares de bandas das condições LB e VC dos extratos proteicos intracelulares foram excisados.

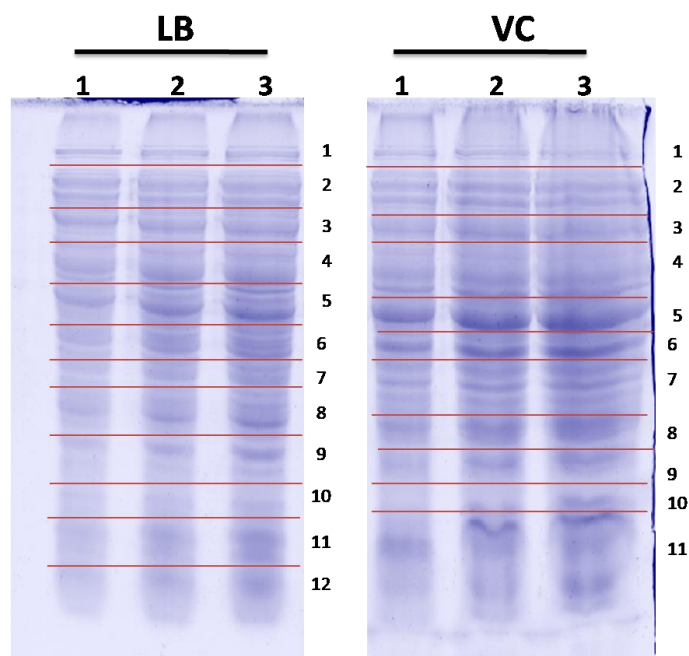


Figura 12: Faixas selecionadas para excisão de bandas de proteínas intracelulares da cepa referência de *Shigella flexneri* 5a M90T em gel unidimensional, com suas triplicatas.

Ao total, 12 e 13 pares de bandas das condições LB e VC, respectivamente, dos extratos protéicos intracelulares foram excisados.

6.3. Análise ESI-LC-MS / MS

6.3.1 Anotação e identificação de proteínas da cepa clínica e de referência.

A partir da extração e digestão das bandas selecionadas, procedeu-se às análises por espectrometria de massas e os resultados foram processados e anotados, conforme descrito em Material e Métodos (item 5.8). A anotação das proteínas identificadas foi feita por meio da submissão das sequências peptídicas ao banco de dados de *Shigella* spp. UNIPROT (database, 297073 sequências, 85153106 resíduos), no entanto, muitas das proteínas obtidas no estudo foram identificadas como proteínas desconhecidas ou hipotéticas.

A partir desta anotação, foi possível identificar o total de proteínas obtidas na fração extracelular e intracelular, excluindo da análise proteínas com identificações repetidas (tabela 4). Para avaliar as proteínas comuns entre as condições, utilizou-se a ferramenta *InteractiVenn*, como descrito no item 5.9.2 do material e métodos.

O extrato proteico extracelular da cepa de referência não foi realizado no presente estudo, devido a limitações da quantidade de amostras contempladas pela proposta submetida à plataforma do LNBIO. No entanto, uma nova proposta encontra-se sob análise de aprovação para o próximo ano.

Tabela 4: Total de proteínas identificadas no extrato extracelular e intracelular.

Fração extracelular			
Cepas	Total de proteínas em meio LB	Total de proteínas em meio com indutor VC	Proteínas comuns entre as condições
<i>S. flexneri</i> str.201	54	37	19
<i>S. flexneri</i> 5a M90T	Não realizado	Não realizado	Não realizado
Fração intracelular			
Cepas	Total de proteínas em meio LB	Total de proteínas em meio com indutor VC	Proteínas comuns entre as condições
<i>S. flexneri</i> str.201	281	156	90
<i>S. flexneri</i> 5a M90T	342	302	212

6.4. Identificação de Proteínas intracelulares das cepas de *S. flexneri*

Realizamos a identificação das proteínas intracelulares de *Shigella flexneri* str.201 e da cepa referência de *Shigella flexneri* 5a M90T. Proteínas intracelulares, assim como as proteínas presentes na superfície de membrana, são fundamentais para composição estrutural e integridade da célula bacteriana (Scribano et al. 2016).

Além disso, a interação de proteínas intracelulares também está envolvida na ativação de processos relacionados à invasão de células epiteliais, como na remodelação de actina (Killackey et al. 2016).

A descrição das proteínas intracelulares identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201, quanto às informações de localização, função e nomenclatura, tanto na condição sem e sob indução, como as proteínas em comum nas duas condições estão descritas nas tabelas 13, 14 e 15 assim como

as proteínas intracelulares identificadas na cepa de referência de *Shigella flexneri* 5a M90T estão descritas nas tabelas 16, 17 e 18, todas contidas em apêndice.

A análise intracelular identificou 281 proteínas intracelulares totais na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201 não exposta ao Vermelho Congo, sendo 191 delas identificadas diferencialmente nesta condição. Já perante a exposição ao indutor químico, detectou-se a presença de 156 proteínas totais, sendo 66 delas exclusivas nesta condição e por fim, 90 proteínas foram comuns em ambas às condições (Figura 13).

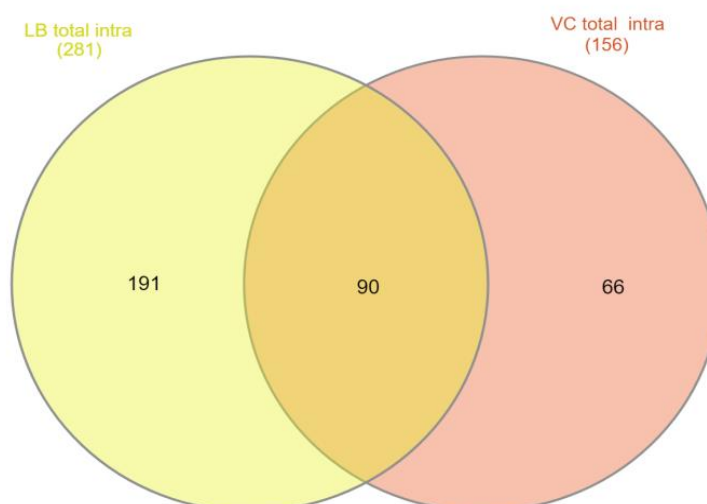


Figura 13: Diagrama de Venn das proteínas intracelulares identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

A análise revelou 90 proteínas comuns entre as condições de não indução (LB) e indução (VC) para secreção proteica, sendo 191 proteínas diferenciais exclusivas ao meio LB e 66 ao meio VC.

Para as proteínas intracelulares identificadas na cepa de referência, detectou-se uma maior quantidade de proteínas, com a presença de 342 proteínas totais no meio não exposto ao Vermelho Congo, sendo 130 delas exclusivas nesta condição. Perante a exposição ao indutor químico, detectou-se a presença de 302 proteínas totais, sendo 90 delas exclusivas sob esta condição e por fim, 212 proteínas foram comuns em ambas às condições (Figura 14).

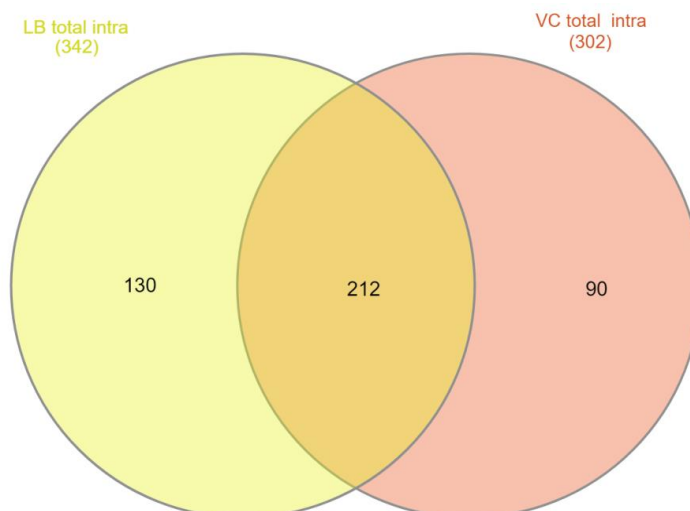


Figura 14: Diagrama de Venn das proteínas intracelulares identificadas na cepa de referência *Shigella flexneri* 5a M90T.

A análise revelou 212 proteínas comuns entre as condições de não indução (LB) e indução (VC) para secreção proteica, sendo 130 proteínas diferenciais exclusivas ao meio LB e 90 ao meio VC.

Um resumo das identificações das proteínas intracelulares de ambas as cepas encontra-se na tabela abaixo:

Tabela 5: Total de proteínas intracelulares identificadas para as cepas clínica e de referência de *S. flexneri*.

Cepa	Proteínas totais	Proteínas comuns entre LB e VC	Proteínas exclusivas em meio LB	Proteínas exclusivas em meio VC
<i>Shigella flexneri</i> str.201	437	90	191	66
<i>Shigella flexneri</i> 5a M90T	644	212	130	90

Visando uma melhor compreensão a respeito dos mecanismos de invasão e patogenicidade de *S. flexneri* cepa clínica, procedeu-se a uma análise direcionada às proteínas exclusivas da condição de vermelho congo. A comparação do perfil

proteômico intracelular, apenas das proteínas exclusivas da condição de Vermelho Congo, entre a cepa clínica e a cepa de referência apontou apenas 11 proteínas comuns em ambas às cepas (Figura 13).

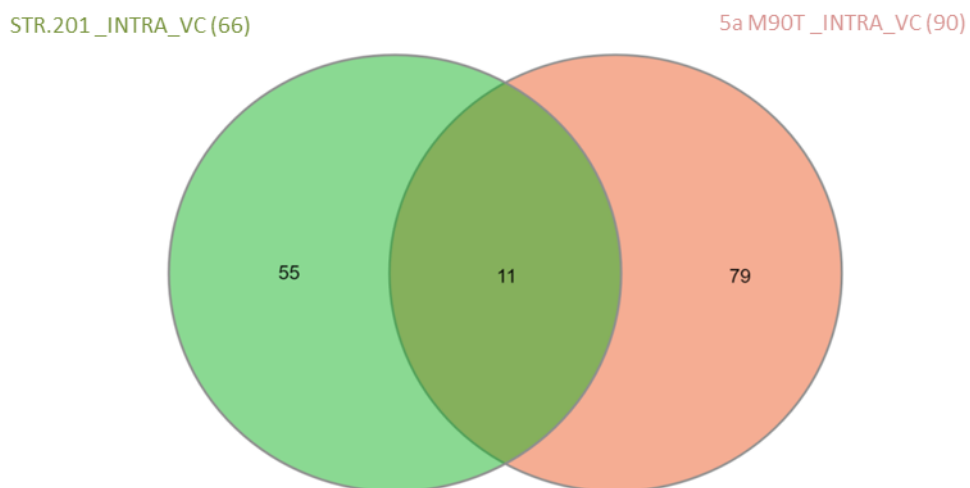


Figura 15: Diagrama de Venn da comparação do perfil proteômico intracelular entre a cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201 e cepa de referência *Shigella flexneri* 5a M90T.

Proteínas exclusivas sob a indução de Vermelho Congo em ambas as cepas.

Proteínas exclusivas da fração intracelular e extracelular, sob indução de Vermelho Congo, da cepa clínica também foram comparadas. A análise indicou que apenas duas proteínas são comuns em ambas as frações, sendo 64 delas exclusivas da fração intracelular e 16 da fração extracelular (Figura 16).

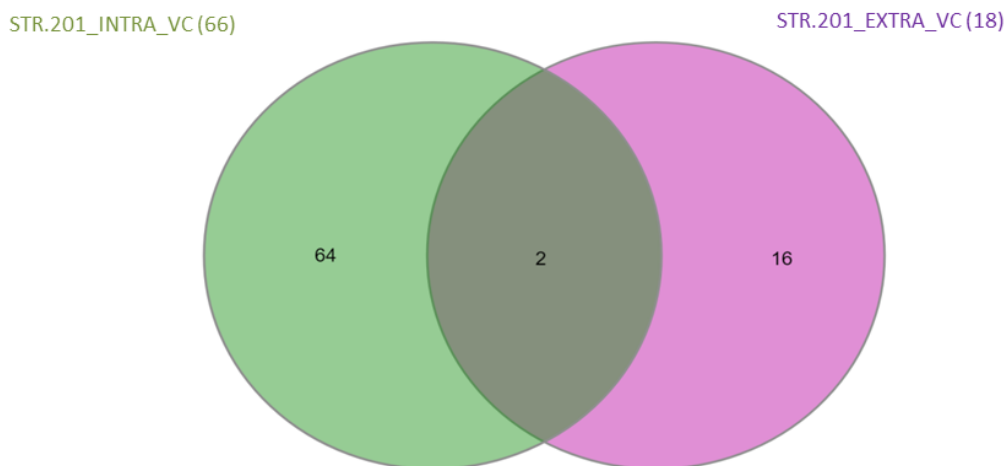


Figura 16:Diagrama de Venn da comparação do perfil proteômico extra e intracelular da cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

Proteínas exclusivas sob a indução de Vermelho Congo em ambas as frações.

6.4.1 Proteínas exclusivas em Vermelho Congo – Cepa Clínica

6.4.1.1 Localização celular

Para a fração de proteínas intracelulares foi visto a prevalência de proteínas no ambiente citoplasmático tanto na condição não induzida (figura 17) quanto para condição submetida à indução de Vermelho Congo (figura 18).

Localização celular
Proteínas exclusivas em meio LB

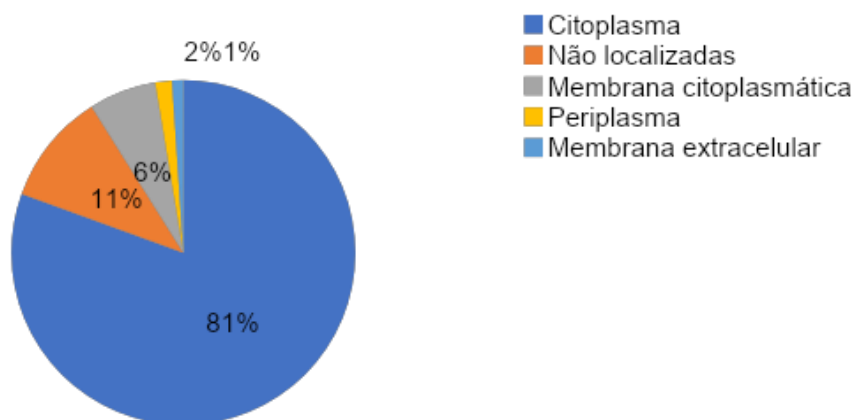


Figura 17: Localização celular das proteínas intracelulares exclusivas presentes em meio LB pertencentes à cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

Localização celular
Proteínas exclusivas em meio VC

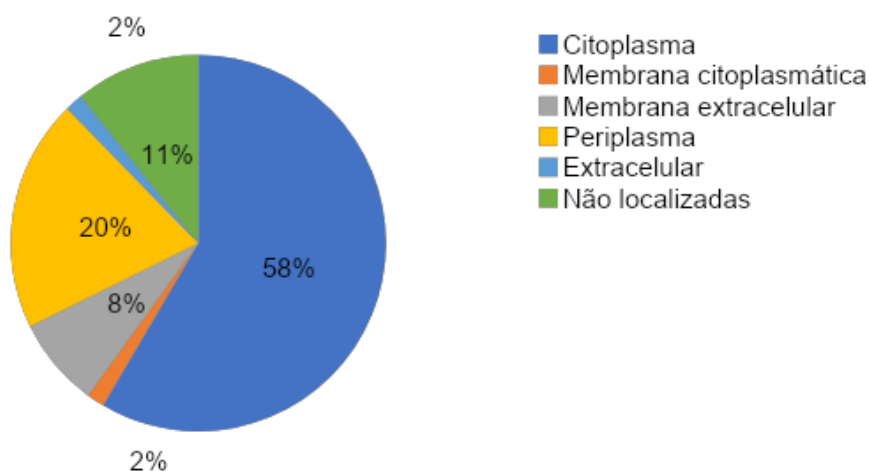


Figura 18: Localização celular das proteínas intracelulares exclusivas presentes em meio VC pertencentes à cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

Todavia, para proteínas exclusivas sob a condição de Vermelho Congo, destacamos a presença em maior porcentagem de proteínas periplasmáticas, proteínas pertencentes à membrana extracelular e ao espaço extracelular, indicando a efetiva ativação da maquinaria de secreção bacteriana, como as

proteínas IpaC e IpaD, as quais compõem o Sistema de Secreção do Tipo III. Ambas as proteínas estão descritas na tabela 14, em apêndice.

6.4.1.2 Funções Moleculares e Interações proteicas

Do total de proteínas exclusivas em VC, as principais funções moleculares identificadas foram de atividade catalítica, ligação, atividade de transporte, moléculas estruturais, e regulação de transcrição (figura 19).

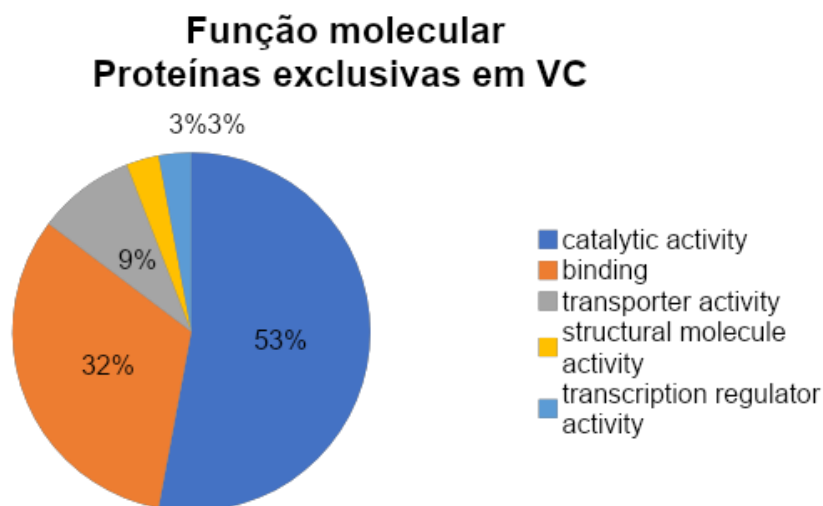


Figura 19: Função molecular de proteínas intracelulares exclusivas em Vermelho Congo na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

Quando comparamos o total de proteínas intracelulares contra o total de proteínas extracelulares, ambas em condições exclusivas de Vermelho Congo, a classificação referente à função molecular permaneceu praticamente inalterada, visto que, apenas 2 proteínas são comuns para ambas as condições (figura 16).

Dentro da categoria de proteínas relacionadas às funções catalíticas, que compreende 53%, destacamos as proteínas listadas na tabela 6.

Tabela 6: Principais proteínas de atividade catalítica encontradas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

Destaque das principais funções de proteínas exclusivas sob a condição de Vermelho Congo.

Gene Name	Principais funções	Referências
YhbS	Pertence à família das acetiltransferases, as quais estão envolvidas em mecanismos de patogênese bacteriana;	(Ren et al. 2017)
LacZ	Proteína envolvida em vias de resposta ao estresse, formação de biofilmes e respostas a ação de antibióticos;	(Nagar et al. 2016)
Pta	Pertence à família das acetiltransferases; está relacionada ao metabolismo, energia e crescimento celular em <i>E.coli</i> ;	(Gummesson et al. 2013, Enjalbert et al. 2017)
Arok	Enzima que catalisa a fosforilação do ácido chiquímico, uma molécula de aplicação biotecnológica;	(Tsai 2017)
MetK	Enzima chave para a divisão celular. Participa de reações de metilação do DNA em <i>E.coli</i> ;	(Wang et al. 2005, Z. W. El-Hajj 2013)
ToIB	Contribui para integridade da membrana celular; Envolvido na localização de quimiorreceptores;	(Henry et al. 2004, Santos et al. 2014a, Gerding et al. 2015)
AccB	Pertence à família das acetiltransferases e participa da via de produção de metabólitos intermediários, os quais possuem aplicação biotecnológica;	(Park et al. 2012)

Estas principais proteínas se relacionam na rede de interação proteica, sejam entre si, ou com outras proteínas nesta mesma categoria de atividade catalítica (figura 20).

Proteínas relacionadas em resposta ao estresse bacteriano, como LacZ, têm sido alvos de investigações para compreensão do desenvolvimento de resistência à antibióticos e mecanismos de virulência. Uma vez que, mudanças ambientais de temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e o próprio contato com hospedeiro no momento da infecção, podem desencadear respostas de defesa dos

microrganismos, como a expressão de genes de virulência (Poole 2012, Nagar et al. 2016).

Nagar (2016), afirma que conhecer e entender as proteínas envolvidas em respostas ao estresse é essencial, pois é possível que elas sejam potenciais alvos para inibição de mecanismos de resistência. O autor discute proteínas chaves relacionadas ao estresse induzido em *E.coli*. Dentre as proteínas identificadas no estudo, temos a LacZ que também foi identificada na cepa clínica de *S.flexneri*, em nosso estudo.

LacZ é descrita como uma β -galactosidase envolvida em resposta ao estresse na espécie de *Escherichia coli*. Esta foi relacionada a três funções principais como: proteínas de resposta ao estresse, a ação de antibióticos e formação de biofilmes. Além de LacZ, as proteínas GlyA e OmpF também estão conectadas a estas principais redes interação (Schneider et al. 2013, Nagar et al. 2016).

Embora GlyA e OmpF não tenham sido detectadas exclusivamente na fração intracelular induzida sob Vermelho Congo, ambas foram identificadas na cepa clínica em estudo.

As principais proteínas com atividades catalíticas discutidas acima, são destacadas na rede de interações proteicas (figura 20), assim como proteínas patogênicas preditas, sendo que algumas destas são classificadas tanto como catalíticas como patogênicas.

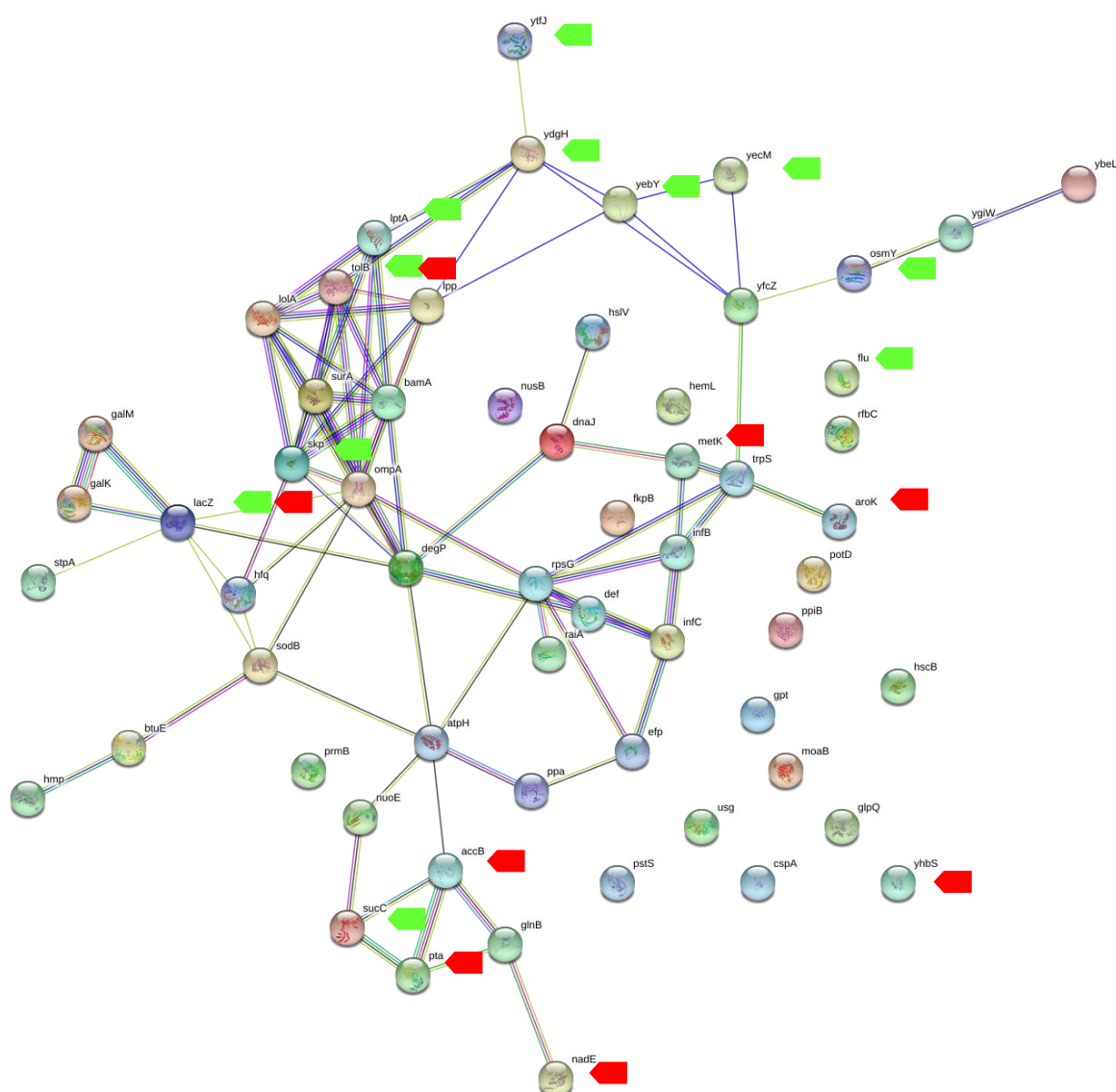


Figura 20: Rede de interação proteica de proteínas intracelulares exclusivas sob a condição de Vermelho congô na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

Em destaque vermelho, as principais proteínas relacionadas às funções catalíticas e em verde estão indicadas as proteínas patogênicas identificadas.

Além da participação em processos metabólicos importantes, destacamos outras funções relacionadas à virulência podem contribuir para a exibição do fenótipo característico da cepa clínica, como as modificações pós traducionais, discutido a seguir.

6.4.1.3. A identificação de proteínas associadas a modificações pós-traducionais pode explicar a virulência de *Shigella flexneri* str.201.

Além da resposta ao estresse bacteriano, outro evento pode estar envolvido ao desenvolvimento da virulência bacteriana. Ren e colaboradores (2017) sugerem que mecanismos pós traducionais, como a acetilação, podem modular diferentes funções, incluindo proteínas envolvidas na patogênese.

A acetilação de proteínas é um tipo de modificação pós-traducional que modifica covalentemente de resíduos de aminoácidos, através de enzimas da classe das acetiltransferases, que são responsáveis pela adição de grupos acetil na cadeia de aminoácidos. Tal mecanismo é reversível e está ligado a principalmente às funções metabólicas, além de estar envolvido em processos como quimiotaxia, resistência ao ácido e invasão bacteriana no hospedeiro (Soufi et al. 2012, Carabetta & Cristea 2017, Ren et al. 2017).

Em *S. typhimurium*, a acetilação é capaz de regular proteínas essenciais de resposta ao estresse, sendo capaz de diminuir a sua virulência e consequentemente permitir a sobrevivência de cobaias infectadas em ensaios *in vivo* (Ren et al. 2019).

Estudos apontam que proteínas acetiladas nesta espécie estão envolvidas não só na virulência, mas também na resistência a antibióticos, como as fluoroquinolonas (Li et al. 2018).

Em *E.coli*, deleções de acetilases e deacetilases impactaram o crescimento bacteriano, metabolismo do acetato, diminuição da sobrevivência em estresse ácido, além de afetar a transcrição gênica (Castaño-cerezo et al. 2014).

Em nosso estudo, proteínas pertencentes à classe das acetiltransferases também foram identificadas: *Acetyltransferase* (YhBS; A0A090NNE5), *Phosphate acetyltransferase* (Pta; A0A090NZ02) e *Biotin Carboxyl Carrier protein of acetyl-CoA carboxylase* (AccB; A0A090NYB8).

Pta e AccB estabelecem uma conexão na rede de interação proteica (figura 21), apresentando ligações de co-expressão, proteínas homólogas interagido em outras espécies, associação em banco de dados acurado e menções de proteínas homólogas em publicações relevantes no PubMed. Ambas estão envolvidas em vias importantes do metabolismo celular (Wolfe 2005).

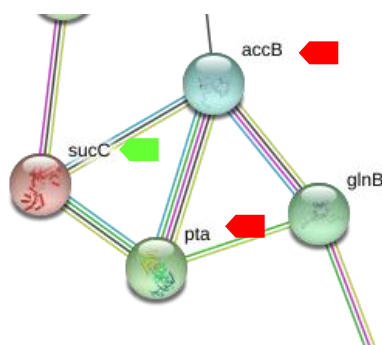


Figura 21: Interações entre as proteínas AccB e Pta, oriundas da cepa clínica de *Shigella flexneri* submetida à indução de Vermelho Congo.

A imagem aproximada é referente à figura 20.

Pta está envolvido na principal via de produção de acetato, que é um metabólito que pode ser utilizado para o crescimento de *E.coli*, embora essa via seja apenas utilizada após o consumo de glicose (Ren et al. 2019).

No entanto, recentemente foi apontado que cepas de *E.coli* podem crescer sob as mesmas vias ao mesmo tempo, ou seja, as vias de regulação podem ser ativadas de acordo com a disponibilidade de substrato, conferindo assim uma vantagem adaptativa, principalmente no ambiente intestinal do hospedeiro, visto que ambas as fontes de crescimento estão disponíveis neste ambiente (Enjalbert et al. 2017).

Tal experimento sugere que patógenos entéricos como *Shigella* spp. podem apresentar esta capacidade, uma vez que este agente infeccioso é capaz de colonizar regiões do intestino humano. Ou seja, esta vantagem adaptativa pode favorecer a permanência deste patógeno no hospedeiro e assim promover o sucesso da infecção diante de condições potencializadas de crescimento e metabolismo.

O metabolismo do acetato também está ligado ao aumento de acetilação, uma vez que cepas de *E.coli* em crescimento sob adição de acetato aumentaram a capacidade do mecanismo de acetilação em comparação a cepas crescidas apenas sob adição de glicose no meio, além disso, células deficientes em Pta apresentaram diminuição de acetilação (Gummesson et al. 2013).

Assim como Pta, AccB também está envolvida na produção de metabólitos importantes para o funcionamento celular. Ela é uma das subunidades da Acetil – CoA carboxilase e produz o malonil-CoA, que é um metabólito intermediário participante na via biossintética de ácidos graxos (Park et al. 2012) .

O malonil–CoA além da sua função bioquímica tem aplicação biotecnológica, pois é um precursor de bioprodutos e têm sido alvos de estudos de engenharia genética para aumentar sua produção em diferentes microrganismos. Seu emprego alcança especialmente a área farmacêutica, como a produção de anticoagulantes, flavonóides e compostos fenólicos de grande valor para a saúde (Park et al. 2012, Shi et al. 2014, Yang et al. 2015, Sun et al. 2018).

Ainda que a acetilação de proteínas seja um mecanismo relatado tanto em eucariotos como em procariotos, ainda há acetiltransferases necessitando de caracterização, como a YhbS, que é uma proteína com poucas informações disponíveis, mas que já tem sido identificada em cepas de *Shigella flexneri* (Marman et al. 2014, Drazic et al. 2016).

Abordagens como a espectrometria de massas e a imunoprecipitação com peptídeos acetilados são descritos como ferramentas que podem auxiliar na identificação de proteínas acetiladas em bactérias, onde a porcentagem de acetilação varia entre as espécies, ficando entre 2 a 45%. No entanto, ainda existem poucos estudos referentes à acetilação em bactérias entéricas, principalmente em espécies virulentas, como *S.flexneri* (Gallego-jara et al. 2014, Smith et al. 2014, Ren et al. 2017).

Diante da identificação e interação de importantes acetiltransferases detectadas na cepa de estudo, sugere-se que esse mecanismo pós-traducional possa estar colaborando para o perfil de virulência exibido pela cepa alvo, afinal, a modulação de processos como replicação, invasão, quimiotaxia, resistência a antibióticos, alterações metabólicas e adaptação frente a mudanças ambientais já são evidenciadas na literatura (Soufi et al. 2012, Castaño-cerezo et al. 2014, Ren et al. 2017).

Outra proteína identificada a destacar em nosso estudo, é a *S-adenosyl methionine synthase* (Metk; A0A090NDY8), que além de ser substancial para a divisão celular, contribuindo em processos de formação de invaginações celulares, também tem aplicação biotecnológica. A repressão de Metk e Succinate--CoA (SucC; A0A090NYL0), igualmente detectada em nosso estudo, contribuem para a produção de pinocembrina, que é um composto farmacológico de grande potencial para tratamento de doenças cerebrais (Wang et al. 2005).

Experimentos envolvendo a técnica de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) envolvendo as proteínas Metk e SucC, favoreceram a maior produção de ATP e Malonil – CoA. Apesar de estas serem essenciais à célula, a técnica não afetou o crescimento bacteriano. Em adição, os estudos possibilitaram a biossíntese em 11,2 vezes mais de pinocembrina em células bacterianas, se tornando uma alternativa para a fabricação do composto, que é naturalmente encontrado em plantas, raízes e mel (Z. W. El-Hajj 2013, Lan et al. 2016)

A pinocembrina é um flavonóide de ação ampla e é apontado como uma droga em potencial para tratamento de isquemia cerebral, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, hemorragia cerebral e aterosclerose (Wu et al. 2011, Lan et al. 2016).

Embora as pesquisas voltadas para a biossíntese de compostos de importância clínica estejam avançando, principalmente por meio da engenharia genética em microrganismos, como *E.coli*, ainda não há estudos relacionados e empregados na espécie de *Shigella*, ainda que esta espécie expresse proteínas e rotas metabólicas que podem ser usadas para este fim.

Além do envolvimento de Metk à biossíntese de compostos, esta enzima está diretamente relacionada à resistência a compostos como o Glifosato, que é um herbicida capaz de inibir o crescimento bacteriano através da via biossintética de aminoácidos aromáticos. Esta via é essencial para a viabilidade celular, assim mutações na mesma são capazes de prejudicar a sobrevivência, impossibilitando o sucesso da infecção (Mir et al. 2013, Fei et al. 2018).

Uma das enzimas principais que participam da via de biossíntese de ácidos aromáticos é a enzima Shikimate kinase (AroK; A0A090NCH2) que foi identificada em nosso estudo, e que além de integrar esta rede, atua na produção do corismato, que é um importante precursor de várias vias biossintéticas (Tsai 2017).

Desse modo, Metk e AroK são enzimas participantes de vias que podem ser alvos de inibidores bacterianos, como o Glifosato. Embora não estejam diretamente conectadas na rede de interação, possuem ligação em comum com outra proteína de atividade catalítica, indicando que estas vias podem ser alvo de estudos no gênero de *Shigella* e não apenas em *E.coli* ou outros gêneros bacterianos.

Do mesmo modo que enzimas chaves atuantes na via metabólica são essenciais, as proteínas estruturais também possuem um papel fundamental, tanto para o equilíbrio e manutenção celular, quanto para mecanismos de defesa.

Proteínas como *Major outer membrane lipoprotein* (Lpp; A0A090NXA1) e TolB (TolB; A0A090NFD6) interagem entre si na camada de peptídeoglicano, promovendo a integridade do envelope celular. Ambas interagem com outra proteína de membrana, *Outer membrane protein* (OmpA; A0A090NMS4), que é considerada um fator de virulência, além de atuar na formação de biofilmes e já é destacada como um antígeno promissor para o desenvolvimento de vacinas (Pore et al. 2011, Turbyfill et al. 2018).

Lpp, TolB e OmpA estão diretamente associadas na rede de interação proteica (figura 22) de *S.flexneri*, assim como já descrito em *E.coli*. Tais proteínas estão envolvidas na localização de quimiorreceptores, liberação de colicinas e interação com bacteriófagos (Santos et al. 2014b).

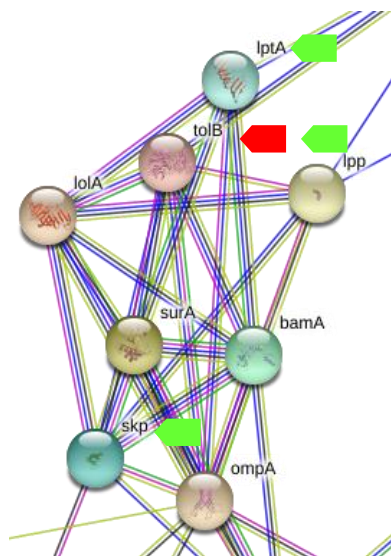


Figura 22: Interações entre as proteínas TolB, Lpp e OmpA, oriundas da cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201 submetida à indução de Vermelho Congo.

A imagem aproximada é referente à figura 20.

Mutações que envolvem componentes importantes da membrana celular, como as proteínas do sistema Tol, incluindo TolB, que é uma subunidade desse sistema, são capazes de produzir a liberação de grandes quantidades de *Outer Membrane Vesicles* (OMVs) (Henry et al. 2004).

As OMVs são produzidas em gram-negativas, porém em baixa concentração, e é considerado um mecanismo de defesa, além de estar envolvida em processos como sinalização celular, patogênese e transferência horizontal de genes (Kulp & Kuehn 2012). Essas vesículas, secretadas para o ambiente extracelular, são capazes de carregar pequenas moléculas, como fatores de virulência às células eucarióticas e podem ser geradas tanto na fase exponencial quanto na fase estacionária do crescimento bacteriano (Mani et al. 2016, Cecil et al. 2019).

Apesar da pouca liberação das vesículas sob condições normais, sua produção e liberação podem ser potencializadas por métodos indutivos, como alterações gênicas e pela própria estimulação do ambiente intestinal (Bauwens et al. 2017).

Fatores como respostas frente à ação de antibióticos, peróxido de hidrogênio e resposta ao SOS podem contribuir para o aumento da produção de vesículas,

consequentemente podendo aumentar a virulência e permitir o estabelecimento da infecção no hospedeiro. Assim, o aumento dessa produção indica um processo de adaptação e sobrevivência do patógeno, como em cepas de *E.coli* patogênicas (Bauwens et al. 2017).

Assim como em cepas enterohemorrágicas de *E.coli* (EHEC), a espécie de *S.flexneri*, assim como outras bactérias Gram-negativas, libera conteúdos vesiculares. Deste modo, o perfil de virulência da cepa clínica de nosso estudo pode estar sendo intensificado através da produção e ação das OMVs, uma vez que estas são capazes carrear toxinas, como as toxinas do tipo Shiga, que também são codificadas em espécies de *Shigella*.

A fim de mimetizar o contato com o ambiente hospedeiro, a indução de Vermelho Congo na cepa de origem clínica em estudo foi de suma importância para que a mesma continuasse exibindo seu perfil de virulência, pois já é descrito que sucessivas passagens em condições *in vitro* que não mimetizam o ambiente infeccioso com o hospedeiro possam diminuir drasticamente as estratégias de sobrevivência e adaptação do patógeno, como a diminuição da produção de OMVs.

A produção de OMVs pode estar relacionada com a entrega eficiente de fatores de virulência no hospedeiro, pois diversos desses fatores já foram identificados na cepa em estudo, como a família das proteínas *lpa*, as quais têm função ímpar na patogênese da shigelose (Cruz et al. 2014).

Apesar de serem classificadas como uma resposta múltipla ao estresse bacteriano (*Envelope Stress Responses* - ESRs), componentes presentes nessas vesículas têm sido investigados como potenciais candidatos vacinais, demonstrando sucesso em ensaios *in vitro*, como a ausência de toxicidade e proteção eficiente contra a colonização de *S.flexneri* (Sidik et al. 2014, Pastor et al. 2017).

Embora *Shigella* spp. apresente diversos mecanismos e estratégias de sobrevivência para escapar da ação do sistema imunológico, existem moléculas

eficientes na eliminação deste patógeno e que são produzidas pelo seu próprio hospedeiro (Hrafn et al. 2010).

Estas moléculas, conhecidas como AMPs (*Antimicrobial peptides/proteins*), têm ação de amplo espectro contra bactérias, vírus e fungos e têm sido estudadas como potenciais alvos terapêuticos para diversas infecções. As AMPs têm sido relatadas como potentes eliminadores de patógenos entéricos, como *E.coli* e *Shigella*, podendo ser isolados de diferentes organismos, como por exemplo, mamíferos e peixes (Noga et al. 2009, Hrafn et al. 2010).

A atividade antibacteriana das AMPs ocorre por meio da ancoragem de aminoácidos presentes em suas estruturas, à membrana celular. Proteínas presentes na membrana interagem com estas moléculas e podem atuar na susceptibilidade, facilitando a ação antibacteriana com o aumento da permeabilidade celular (Chang et al. 2012).

Na família das enterobactérias, destaca-se a participação da *Major Outer Membrane Lipoprotein* (Lpp; A0A090NXA1), uma lipoproteína fundamental na sensibilidade as AMPs, uma vez que, seu bloqueio através de anticorpos anti-Lpp impede que a membrana bacteriana fique permeável em espécies como *E.coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *S. marcescens* e *S. typhimurium* (Chang et al. 2012).

Estima-se que Lpp tenha cerca de 750.000 cópias em células de *E.coli*, sendo uma das mais abundantes na espécie. Esta, também opera como uma barreira contra antibióticos, metabólitos e ações enzimáticas, como a proteólise (Cowles et al. 2011).

Deste modo, Lpp configura-se como alvo de investigações, principalmente no gênero de *Shigella*, onde há carência de informações. Uma vez que esta lipoproteína, detectada em nossos achados, pode atuar como um importante alvo terapêutico para a prevenção shigelose, pois a mesma contribui para a atividade de moléculas protetoras que são naturalmente produzidas pelo seu hospedeiro.

6.4.1.3 Predição de Proteínas Patogênicas

As proteínas consideradas como patogênicas, foram classificadas de acordo com os parâmetros do software MP3, que faz a estimativa da capacidade patogênica utilizando dados da sequência, informações relacionadas a patogênese, como: virulência, secreção, invasão e resistência a drogas. Desse modo, a predição é apenas uma ferramenta que direciona a pesquisa de aprofundada de como tais proteínas atuam, além de fornecer bases para estudos de validação experimental (Gupta et al. 2014)

Estimou-se que a fração intracelular da cepa clínica de *S.flexneri* str.201 apresentou maior porcentagem tanto no número total proteínas patogênicas (tabela 7), como no total de proteínas exclusivas quando a mesma foi exposta ao indutor de Vermelho Congo, em comparação com a cepa de referência do estudo (tabela 8).

Tabela 7: Total de proteínas patogênicas identificadas em ambas as cepas.

Proteínas identificadas através da ferramenta MP3, para a estimativa na cepa de referência e cepa clínica expostas ao VC.

TOTAL DE PROTEÍNAS PATOGÊNICAS	
CEPA	Meio VC
<i>Shigella flexneri</i> str.201	28 (17,9%)
<i>Shigella flexneri</i> 5a M90T	35 (11,5%)

Tabela 8: Proteínas patogênicas exclusivas identificadas em ambas as cepas.

Proteínas identificadas através da ferramenta MP3, para a estimativa de proteínas patogênicas exclusivas nos meios VC quando comparadas ambas as cepas.

PROTEÍNAS PATOGÊNICAS EXCLUSIVAS EM MEIO VC	
CEPA	Meio VC
<i>Shigella flexneri</i> str.201	14 (24,4%)
<i>Shigella flexneri</i> 5a M90T	12 (15,1%)

As 14 proteínas patogênicas exclusivas da cepa clínica sob indução de VC, quando comparadas à cepa de referência, estão listadas na tabela 9.

Tabela 9: Proteínas patogênicas exclusivas da cepa clínica de *S.flexneri* str.201.

Proteínas patogênicas preditas pelo MP3.

ACESSO	GENE NAME	PREDIÇÃO
A0A090NXA1	PstS	Patogênica
I6H289	LacZ	Patogênica
A0A0H2V1S1	Flu	Patogênica
A0A127GV72	IpaC	Patogênica
A0A090NFD6	TolB	Patogênica
A0A0H9GHL4	IpaD	Patogênica
I6H561	OmpD	Patogênica
A0A090NFG3	YecM	Patogênica
A0A090NGX6	YdgH	Patogênica
A0A090NLX4	Skp	Patogênica
A0A090NEW9	OsmY	Patogênica
A0A090NX61	YtfJ	Patogênica
A0A090NL57	LptA	Patogênica
A0A090NG88	YebY	Patogênica

Tais proteínas patogênicas estão sinalizadas na rede de interação proteica (figura 20), com exceção das proteínas IpaC, IpaD e OmpD, pois estas são apenas identificadas quando comparadas ao banco de dados de *Shigella* spp.; na própria plataforma do STRING. Dados disponíveis em: <<https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=mEaGWYS2ogpf>>.

Proteínas como IpaD e IpaC, além de invasinas e diversas proteínas de membrana já estão descritas na literatura como proteínas patogênicas, no entanto, proteínas como Phosphate-binding protein (PstS) e Beta-galactosidase (LacZ), por exemplo, que são proteínas envolvidas no metabolismo bacteriano, também foram identificadas como patogênicas (Runyen-Janecky & Payne 2002, Runyen-Janecky et al. 2005, Husain 2010, Hermanson 2013).

PstS é uma proteína faz parte do sistema de captação de fosfato em diversas espécies bacterianas, como *E.coli*, *Streptococcus mutans* e *Mycobacterium tuberculosis* e *Shigella* spp. O sistema atua no transporte transmembranar de íons fosfato, contribuindo para o crescimento celular e é ativado na escassez de fosfato, sendo um dos principais sistemas de aquisição de

fosfato em *Shigella* spp. (Runyen-Janecky & Payne 2002, Peirs et al. 2005, Luz et al. 2012, Suh et al. 2014).

Além do metabolismo de fosfato, PstS está envolvido na virulência de *S.mutans* e *M.tuberculosis*, pois a mutação desse sistema prejudica atividades como: a adesão, secreção de polissacarídeos, além de promover a atenuação da virulência (Peirs et al. 2005, Luz et al. 2012).

O perfil do gene que codifica PstS tem sido avaliado quanto as suas taxas de alteração, mostrando que em diversas espécies da classe das proteobactérias, ele pode apresentar mudanças na sua composição, o que sugere que este sistema tem evoluído entre as espécies para que a captação de fosfato seja favorável em diferentes condições ambientais (Jha et al. 2018).

Mutações nos diferentes reguladores do sistema PstS têm sido descritos, a fim investigar a relação deste sistema com a regulação gênica de virulência em diferentes bactérias. Como exemplo, a mutação no gene que codifica a proteína PstS em *Vibrio cholerae*, bactéria causadora da diarreia da cólera, foi capaz de minar a colonização dessa espécie, assim como diminuir a expressão de genes de virulência em ensaios *in vitro*. Porém, em condições *in vivo*, é possível que o ambiente intestinal do hospedeiro favoreça a regulação e transcrição de genes envolvidos na virulência, devido às taxas de fosfato presentes nesta região (Chekabab et al. 2014).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria responsável por altas taxas de infecções nosocomiais e uma espécie altamente resistente a antibióticos, a deficiência de reguladores metabólicos do fosfato induzem a produção de fosfolipases que medeiam o aumento da sua colonização. Além disso, já é relatado que cepas clínicas resistentes possuem altas produções de PstS, causando a morte de camundongos infectados (Chekabab et al. 2014).

Em cepas enterohemorrágicas (EPEC) e enteropatogênicas (EHEC) de *E.coli*, a deleção do sistema de fosfato gerou deficiência na adesão em células epiteliais em ensaios *in vivo*. Em estudos *in vitro*, o aumento da produção de toxinas do tipo Shiga foi provocado pela limitação de fosfato disponível. Além

disso, genes relacionados em resposta ao estresse oxidativo e ao ácido, por exemplo, foram diferencialmente expressos nas cepas mutantes (Chekabab et al. 2014, Chekabab, Samuel Mohammed Jubelin et al. 2014).

Ainda que este importante sistema esteja envolvido na virulência, metabolismo e sobrevivência de diferentes espécies bacterianas patogênicas para o hospedeiro humano, se faz necessário investigar o papel de PstS e seus reguladores em *Shigella* spp. Pois, assim como *E.coli*, *P.aeruginosa* e *S.mutans*, este gênero apresenta ampla estratégia para o estabelecimento de sua infecção, ou seja, é possível que este seja mais um mecanismo que contribui para o perfil de virulência apresentado pelo patógeno em estudo.

Além de sistemas metabólicos, auto transportadores como a *Outer membrane fluffing protein* (Flu; A0A0H2V1S1) também estão relacionados com perfis de virulência, como a agregação bacteriana, que favorece a formação de biofilmes, e adesão celular (Woude & Henderson 2008).

Flu é relatada como um das proteínas mais abundantes na espécie de *E.coli*, mas diversas Gram-negativas também apresentam tal proteína, como as espécies de *Salmonella enterica* e *Klebsiella pneumoniae* (Schauer et al. 2018).

Parte de seu domínio está associada a fenótipos de virulência principalmente em *E.coli*, pois a formação de estruturas de biofilme faz com que haja resistência a ação neutrofílica, conseqüentemente aumentando a colonização e persistência bacteriana na bexiga de cobaias infectadas (Vo & Mart 2017).

Deleções de alelos no gene que codifica Flu são capazes de reduzir a formação de estruturas sésseis, como os biofilmes, facilitando assim a colonização e o estabelecimento da infecção bacteriana (Woude & Henderson 2008).

Embora a função de Flu seja investigada em *E.coli* e em outras Gram-negativas, há escassez de pesquisas em *Shigella* spp. Além do que, apesar de sua abundância na espécie de *E.coli*, existem variações gênicas em diferentes cepas desta mesma espécie, indicando que há variações nos fenótipos associados à sua virulência (Vo & Mart 2017). Ou seja, tanto a abundância, como

funções envolvidas à patogênese e a variação gênica desta proteína são lacunas a serem examinadas no gênero de *Shigella*.

Outer membrane porin protein (OmpD; I6H561), também descrita como uma proteína de membrana, a qual pertence a uma classe fundamental para constituição da membrana celular, como as porinas, foi identificada a partir da indução de Vermelho Congo na cepa clínica de *S.flexneri*.

OmpD, uma proteína muito reportada em *Salmonella enterica*, assim como em *E.coli*. A OmpD, assim como outras proteínas de membrana, faz parte do conjunto de porinas presentes em diferentes bactérias (Porin et al. 2003).

No entanto, a abundância de tal proteína pode ser alterada de acordo com as condições fisiológicas em que o microrganismo é exposto, como por exemplo, em *Salmonella enterica*, sorovar *Typhimurium*, na qual o baixo nível de osmolaridade afeta a expressão de OmpC, enquanto que a regulação de OmpD não é modificada em cepas mutantes para este gene. Já o fator de anaerobiose promove o aumento da quantidade de OmpD, ao passo que é diminuída pelo baixo pH, ou seja, estes dois mecanismos de regulação atuam por vias independentes (Porin et al. 2003).

OmpD é regulada através de sRNAs (*Bacterial Small RNA*) que se ligam a Hfq principalmente na fase estacionária, pois o ambiente de crescimento está sujeito a diversos eventos de estresse para o microrganismo, inclusive a expulsão de substâncias tóxicas como o *methyviologen* (Porin et al. 2003, Frohlich et al. 2012).

Estudos ressaltando a importância de OmpD são muito bem descritos para o gênero *Salmonella*, no entanto, a literatura não dispõe de informações suficientes sobre esta proteína no gênero de *Shigella*, apontando que mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar a participação, assim como a caracterização desta proteína neste gênero.

Em contraste, temos as proteínas IpaC (*Invasin protein IpaC*; A0A127GV72) e IpaD (*Invasin protein IpaD*; A0A0H9GHL4), que são invasinas extensamente estudadas na literatura. Além de atuarem como fatores principais de virulência e

compõem a maquinaria de secreção celular em *Shigella* spp., são descritos como potenciais antígenos para a produção de vacinas e adjuvantes (Carayol & Van Nhieu 2013, Chain 2018, Ndungo et al. 2018).

Embora a resposta imune a esses efetores tenha sido bastante investigada em cobaias, as respostas imunológicas em humanos ainda não é totalmente compreendida (Mattock & Blocker 2017, Turbyfill et al. 2018).

Em *S.flexneri*, IpaC já tem sido utilizado como um dos principais componentes de complexos imunogênicos contra a shigelose. Imunizações contendo esta proteína têm mostrado resultados significativos tanto para a produção de anticorpos, quanto para a redução de efeitos da doença, como a perda de peso nas cobaias. Além disso, destaca-se a proteção eficaz tanto para camundongos quanto para porquinhos-da-índia para diferentes espécies de *Shigella* spp. (Turbyfill et al. 2018).

Imunizações em cobaias utilizando a proteína IpaD também geraram respostas imunológicas muito promissoras, como o recrutamento intenso de neutrófilos e macrófagos, alta produção de anticorpos IgG, citocinas pró-inflamatórias e regulatórias. A proteção contra a infecção pulmonar em modelo murino também foi eficiente contra as espécies de *S.flexneri* e *S.sonnei* (Heine et al. 2014).

Tanto IpaC como IpaD são fundamentais para abordagem de potenciais alvos vacinais contra a shigelose, uma vez que, estas proteínas são altamente conservadas neste gênero (Parsot 2009). Além dessas invasinas, outros alvos podem ser combinados para a formulação de complexos imunogênicos, como o INVAPLEX (Turbyfill et al. 2018), que é composto de invasinas e outras proteínas como Mdh, GlyA, SucC, Pst, IcdE e Eno, as quais também foram identificadas na cepa de *S.flexneri* do presente estudo.

Outro alvo em potencial para ação terapêutica contra Gram-negativas é o sistema de translocação Lpt, mais especificamente uma das subunidades que compõe esse sistema, que é a *Lipopolysaccharide export system protein* (LptA; A0A090NL57), também conhecido como YhbN. Este sistema atua no transporte

de LPS para a membrana externa, que além de compor a estrutura celular bacteriana, contribui para resistência aos ataques de agentes externos, como os antibióticos (Zhang et al. 2018).

Deste modo, a biossíntese e o transporte de lipopolissacarídeos têm sido apontados como alvos de novas drogas, como em *E.coli*.

Compostos que interagem especificamente como a LptA são capazes de prejudicar o sistema de transporte de LPS, conseqüentemente afetando o crescimento e alterando a morfologia bacteriana. Sugere-se que este sistema também possa ser prejudicado em outras bactérias Gram-negativas, como *Shigella* spp. (Zhang et al. 2018).

Identificou-se que LptA interage com outro conjunto de proteínas também classificadas como patogênicas, como YdgH (A0A090NGX6) (Figura 20). No entanto, há escassez de dados sobre esta proteína, embora seu domínio seja conservado entre as enterobactérias (Eletsky et al. 2014).

YdgH foi identificado como um novo efetor envolvido na patogênese de *Salmonella enterica*, porém secretada por vias alternativas ao Sistema de Secreção do Tipo III. Sugere-se que a secreção deste efetor seja pela liberação de vesículas, mas o mecanismo ainda é desconhecido. Além disso, foi visto que mutações nesta proteína atenuaram parcialmente a virulência de *Salmonella typhimurium* (Niemann et al. 2011, Kidwai et al. 2013).

Embora não haja maiores informações sobre a função ou como esta proteína está envolvida na virulência de *Shigella* spp., foram encontradas interações proteicas de YdgH a outras proteínas igualmente classificadas como patogênicas, tais como: YtfJ(A0A090NX61), YebY(A0A090NG88)e YecM(A0A090NFG3).

As interações predominantes entre tais proteínas foram de coocorrência de genes e menções de proteínas homólogas em publicações relevantes no PubMed, segundo o critério de classificação de interações do STRING. No entanto, apesar da interação e da classificação obtida, tais proteínas ainda não são caracterizadas na literatura.

Outra proteína patogênica identificada e que carece de informações relacionadas ao gênero de *Shigella* é a *Osmotically-inducible protein Y* (OsmY; A0A090NEW9). OsmY é uma lipoproteína encontrada em Gram-negativas e contribui para adaptação ao ambiente gastrointestinal de estresse osmótico (Radford et al. 2018).

Além de lipoproteínas, a chaperona periplasmática *Outer membrane protein* OmpH (Skp; A0A090NLX4), também foi classificada como patogênica.

A principal função das chaperonas consiste no auxílio para o dobramento correto de proteínas, desempenham a função de proteínas acessórias que assistem outras proteínas através da atividade de direcionamento e ainda impedem a agregação proteica. Tais funções descrevem um estado de equilíbrio e que também pode ser denominado como proteostase, ou seja, uma homeostase proteica dentro do ambiente periplasmático (Tyedmers et al. 2010, Hartl et al. 2011, Madigan et al. 2016).

Para exercerem suas devidas funções, as chaperonas dependem da energia proveniente da hidrólise de ATP ou de ATPases, assim, mutações envolvidas nessas atividades podem comprometer o fenótipo e o crescimento celular bacteriano, por exemplo (Barducci & Rios 2015).

OmpH é capaz de interagir com as OMPs A e X, por exemplo, formando complexos funcionais, dinâmicos e flexíveis (Burmam et al. 2013). Estes complexos constituem partes fundamentais no processo de biogênese das OMPs, uma vez que estas estruturas são fundamentais para a sobrevivência celular, pois funcionam como canais seletivos, permitindo a entrada de nutrientes, compostos e substâncias favoráveis a sua manutenção (Rigel & Silhavy 2012).

Skp também atua como uma holdase, assim, evita a agregação de proteínas transportadas para o periplasma, conseqüentemente poupando o estresse celular, pois este evento impossibilita a orientação correta para o destino final das proteínas de membrana sintetizadas (Rigel & Silhavy 2012, Burmam et al. 2013, Entzminger et al. 2013).

A interação de OmpH com as proteínas translocadas para o periplasma é facilitada pela sua estrutura tridimensional (Figura 23), que é semelhante a uma água viva, isto é, suas cadeias se dispõem como tentáculos e se moldam à conformação da proteína a ser envolvida (Korndörfer et al. 2004, Walton & Sousa 2004).

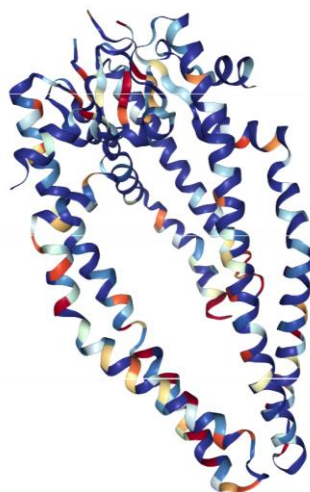


Figura 23: Estrutura tridimensional da chaperona periplasmática Skp (OmpH) de *Escherichia coli*.

Fonte: Korndörfer et al. 2004

Em *Shigella flexneri*, a mutação desta proteína não causou alteração no fenótipo de formação de placas em células Henle, porém, quando havia mutação dupla tanto de Skp como de DegP, que também é uma chaperona importante, a cepa não apresentou tal fenótipo. Já na superexpressão de Skp em cepas deficientes de DegP, o fenótipo foi restituído, sugerindo-se que ambas chaperonas possuem funções complementares (Purdy et al. 2007).

A localização de IcsA também foi prejudicada em ambas as mutações, culminando na deficiência da disseminação bacteriana, pois a IcsA é uma proteína de membrana que se relaciona com outras proteínas do seu hospedeiro para que haja formação da calda de aquitina, que é o mecanismo que permite a mobilidade bacteriana entre as células epiteliais do intestino humano (Purdy et al. 2007).

Sklar e colaboradores (2007) demonstraram que deleções não apenas em Skp, mas em outras chaperonas em *E.coli*, afetaram a conformação e direcionamento de proteínas, como OmpA.

Diferentemente de *E.coli*, o estudo de Rowley e colaboradores (2011) apontou que a mutação de Skp em *Salmonella Typhimurium* não compreende totalmente a biogênese das OmPs e que essa deleção não é capaz de alterar no fenótipo desta bactéria em comparação à cepa selvagem. No estudo, características como: o perfil de crescimento, susceptibilidade a antimicrobianos ou estresse oxidativo não foram alteradas. No entanto, o ensaio *in vivo* de infecção em cobaias manifestou a diminuição do número de bactérias em determinados órgãos, com exceção das Placas de Peyer, fato este, que o grupo indica ser um mecanismo de proteção, motivando assim as pesquisas para futuros candidatos vacinais utilizando a deleção em Skp (Rowley et al. 2011).

A mutação de Skp também acarretou efeitos em *Yersinia enterocolitica*, uma enterobactéria causadora de diarreia e que assim como o gênero de *Shigella*, também é transmitida pela via fecal-oral em hospedeiro humano. Apesar desta mutação não alterar a integridade da membrana e nem exibir alteração em seu perfil de crescimento, ela ocasionou maior susceptibilidade a eritromicina, que é um macrolídeo que atua na inibição da síntese de proteínas na atividade traducional (Gaynor & Mankin 2003, Weirich et al. 2017).

A deleção da chaperona gerou ainda a indução de estresse celular através da formação de OMVs (*Outer Membrane Vesicles*) de modo que também diminuiu a abundância da proteína FuyA, que é um receptor responsável pela absorção de ferro. Além disso, infecções sistêmicas e orais induzidas em modelo murino apresentaram menor abundância de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em órgãos como os lífonodos mesentéricos e por fim, as cepas mutantes revelaram maior sensibilidade à ação do complemento sérico (Weirich et al. 2017).

Embora diversos estudos envolvendo mutações, deleções e alterações em proteínas participantes de importantes de vias metabólicas, regulatórias ou virulência bacteriana, os estudos ainda são escassos no gênero de *Shigella*.

A detecção e caracterização destas proteínas e como elas interferem em diferentes processos, podem auxiliar a esclarecer os fenótipos de virulência exibidos em cepas clínicas, por exemplo.

6.5. Proteínas extracelulares identificadas de *S. flexneri* str.201

Para a fração protéica extracelular da cepa clínica de *S. flexneri*, foram identificadas 91 proteínas. Deste total, observou-se por meio da ferramenta *InteractiVenn* (Heberle et al. 2015), 54 proteínas identificadas em meio LB e 37 pertencentes ao meio de VC. Dezenove proteínas foram comuns entre os meios e 18 delas exclusivas para condição VC e 35 para a condição LB.

A partir do diagrama de Venn, verificou-se a comparação entre as proteínas secretadas nos diferentes meios, indicando a presença de 19 proteínas comuns entre eles, no entanto, a maior quantidade de proteínas foi observada no meio ausente do indutor químico de Vermelho Congo, como já se era esperado a partir da análise da intensidade de proteínas presentes no gel unidimensional.

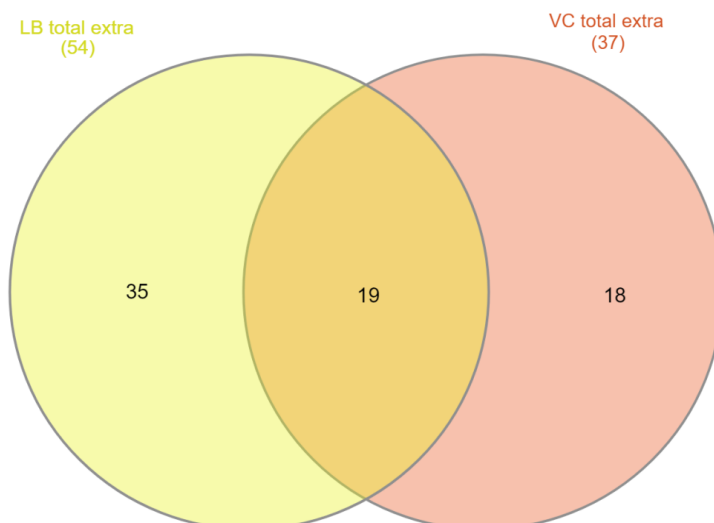


Figura 24: Diagrama de Venn de proteínas extracelulares identificadas na cepa de *Shigella flexneri* str.201.

A análise revelou 19 proteínas comuns entre as condições de não indução (LB) e indução (VC) para secreção proteica, sendo 35 proteínas diferenciais exclusivas ao meio LB e 18 ao meio VC.

A descrição das proteínas extracelulares identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201, quanto às informações de localização, função e nomenclatura estão listadas na tabela 10,11 e 12, em apêndice.

6.5.1 Proteínas exclusivas em Vermelho congo – Cepa Clínica

6.5.1.1Localização Celular

Dentre as proteínas extracelulares exclusivas em meio LB, identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri*, foi possível definir que a maior porcentagem de proteínas está localizada no ambiente citoplasmático, contemplando 77% do total,

seguido de proteínas presentes nas estruturas membranares e periplasma (Figura 25).

Para a cepa clínica submetida à indução de Vermelho Congo, foi observada uma menor porcentagem de proteínas presentes no citoplasma, quando comparado à cepa sem indução, categorizando 61% no total (Figura 26).

Embora a maioria destas proteínas esteja inserida no ambiente citoplasmático, é possível que muitas delas sejam transportadas a outras localidades, como é o caso de proteínas que apresentam peptídeo sinal em sua sequência, fazendo com que sejam capazes de serem direcionadas ao ambiente extracelular, ainda que esteja localizada no citoplasma ou em proteínas que não possuem sua localização celular descrita.

A exemplo disso, nossos achados apontam que proteínas que não possuem localização celular totalmente descritas, como proteína YgiW e a proteína Malato Desidrogenase (Protein YgiW; A0A090NHZ2 e Malate Dehydrogenase; A0A090NKL2), que possuem peptídeo sinal não citoplasmático, indicam que ambas podem estar ser redirecionadas ao ambiente extracelular (Rezwan et al. 2007, Zückert 2014).

Além das proteínas citoplasmáticas, foram detectadas proteínas presentes em estruturas membranares e periplasmáticas, que além de compor a estruturação da barreira celular, também exercem papéis em funções metabólicas, transporte de moléculas, homeostasia, funções energéticas, comunicação celular e podem estar envolvidas em reações enzimáticas (Poetsch & Wolters 2008, Cournia et al. 2016).

Localização celular
Proteínas exclusivas em meio LB

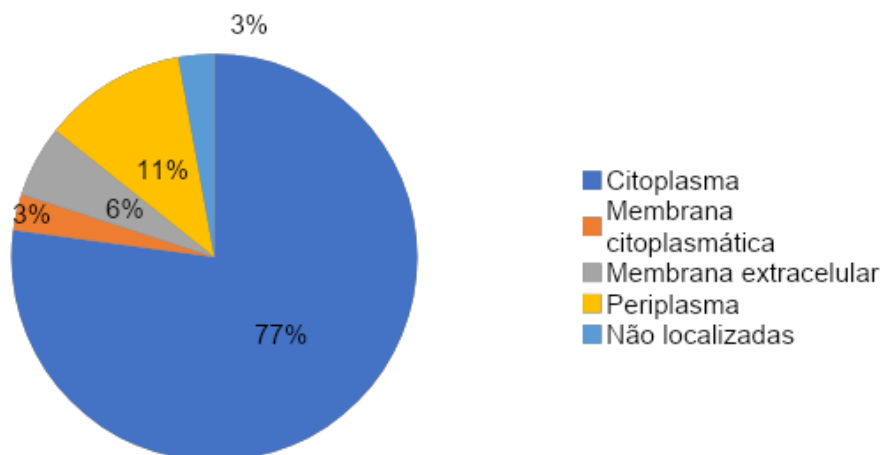


Figura 25: Localização celular das proteínas extracelulares exclusivas presentes em meio LB pertencentes à cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

Localização celular
Proteínas exclusivas em meio VC

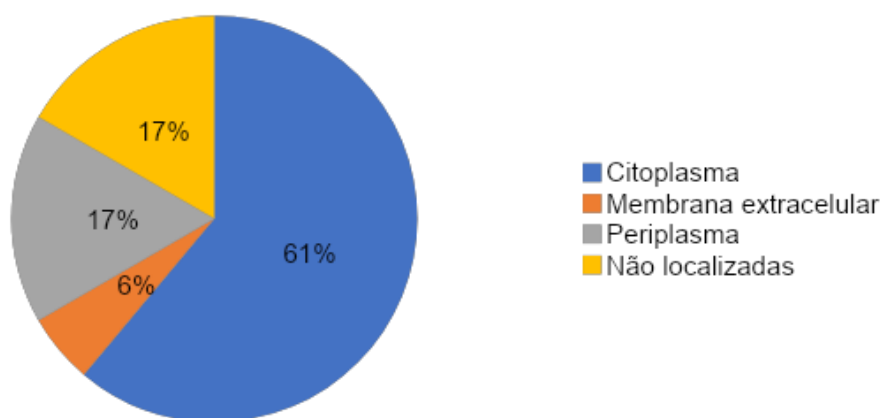


Figura 26: Localização celular das proteínas extracelulares exclusivas presentes em meio VC pertencentes à cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

6.5.1.2 Funções Moleculares e Interações proteicas

Para as proteínas extracelulares exclusivas na condição de Vermelho Congo, a maior parte das proteínas possui a função molecular de atividade catalítica (figura 27).

A classificação das categorias foi feita através da ferramenta *Panther Data Base Classification System (Panther DB)*, disponível em www.pantherdb.org.

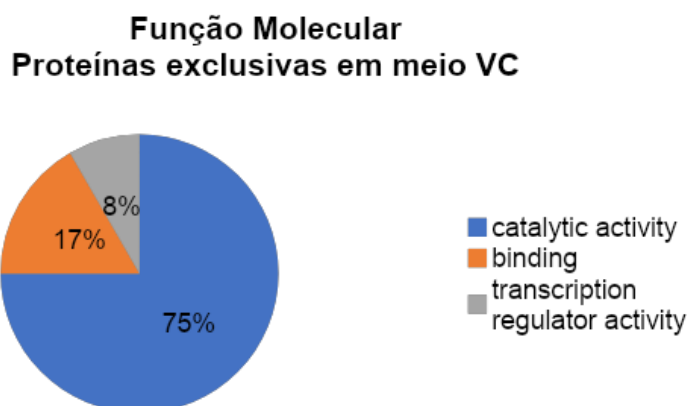


Figura 27: Função molecular de proteínas extracelulares exclusivas em Vermelho Congo na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

Dentro da categoria de proteínas relacionadas às funções catalíticas, destacamos a importância de três delas, que são: GlyA (*Serine hydroxymethyl transferase*; A0A090NXY0), Mdh (*Malate dehydrogenase*; A0A090NKL2) e Adk (*Adenylate kinase*; A0A090NYV0), que pertencem às classes das metiltransferases, desidrogenases e nucleotídeo quinases, respectivamente.

A proteína GlyA está envolvida na proteção contra estressores metabólicos, que causam danos à célula, como o *reactive enamine 2-aminoacrylate (2AA)*, que é uma enzima que atua no metabolismo celular, porém quando é encontrada sob acúmulo é capaz de afetar o fenótipo de crescimento e motilidade (Borchert&Downs, 2017).

Sua inativação em *Salmonella enterica* demonstrou diminuição do fitness bacteriano, assim como proteínas relacionadas a ela também são fundamentais para o equilíbrio metabólico (Flynn et al. 2013, Ernst & Downs 2016).

A proteína Mdh também está envolvida em resposta ao estresse celular de diferentes quantidades de Zinco (Zn), que é um elemento primordial para todos os organismos. No entanto, a literatura carece de informações sobre esta proteína

(Easton et al. 2006). Já a proteína Adk participa de processos relacionados manuntenção de energia e sobrevivência da célula (Thanh et al. 2014).

O estudo de Nagar e colaboradores (2016) mapeou redes de interação proteica para elucidar mecanismos de resposta ao estresse biológico em *E.coli*. O estudo apontou 24 proteínas fundamentais envolvidas nessa resposta, dentre elas a Mdk, Adk e GlyA. No entanto, apenas GlyA não estava conectada diretamente na rede de interação.

Em nossos achados, tais proteínas interagem ativamente, inclusive com GlyA. As associações identificadas na rede biológica foram classificadas em: Interações conhecidas, Interações previstas e Outras interações (figura 26).

A rede de interações proteicas foi feita através da ferramenta STRING (versão 11.0, disponível em www.string-db.org), que utiliza informações genéticas para a montagem da rede biológica de proteínas.

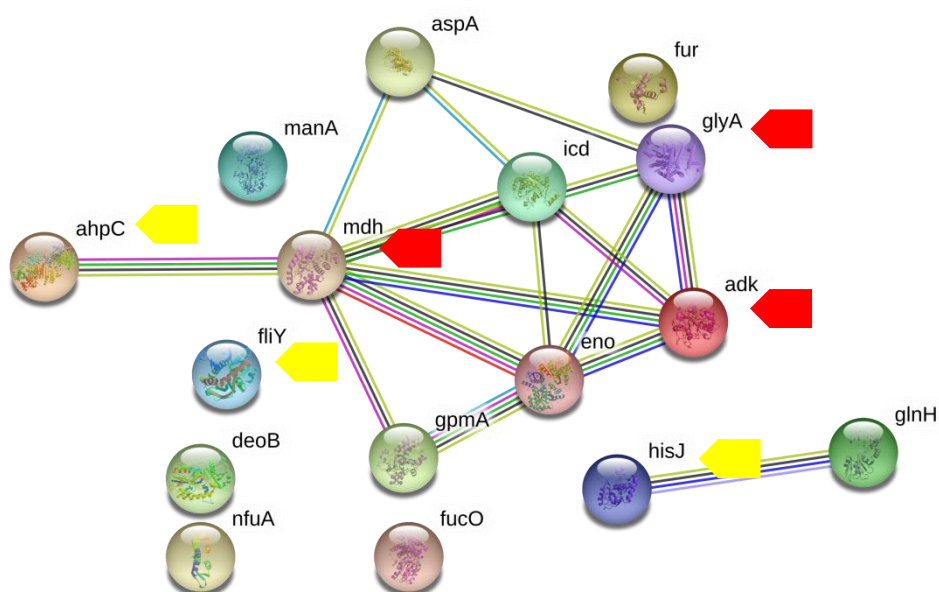


Figura 28: Rede de interação proteica de proteínas extracelulares exclusivas sob a condição de Vermelho congô na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.



Em destaque vermelho, proteínas envolvidas nas respostas ao estresse celular com suas respectivas interações e em destaque amarelo, estão indicadas as proteínas patogênicas preditas pelo software MP3.

Nesta figura, destacamos tanto as proteínas envolvidas na resposta ao estresse celular, como as proteínas patogênicas, em amarelo e vermelho, respectivamente.

As proteínas envolvidas na resposta ao estresse celular foram indicadas a partir das informações descritas na literatura, enquanto as proteínas preditas como patogênicas foram sinalizadas com base na análise de dados da ferramenta MP3.

6.5.1.3 Predição de Proteínas Patogênicas

A predição de proteínas patogênicas foi realizada através da ferramenta *Predict Pathogenic Proteins in Metagenomics Datasets* – MP3, que tem sido utilizada recentemente em vários estudos, principalmente com o objetivo de encontrar novos alvos para potenciais candidatos vacinais, tanto para humanos, como para animais (Kästner et al. 2015, Pahil et al. 2017, Álvarez-estrada et al. 2018, Hisham & Ashhab 2018).

Quando a fração de proteínas extracelulares foi comparada à fração de proteínas intracelulares, ambas referentes à cepa clínica sob condição de

Vermelho Congo (Figura 16), obtivemos apenas 3 proteínas patogênicas localizadas, dado o baixo número totais de proteínas identificadas. As proteínas patogênicas identificadas foram: HisJ (A0A090NAX9), AhpC(A0A090NXW3) e GlnH (A0A090NEW6).

No entanto, quando as proteínas patogênicas preditas foram submetidas ao banco de dados de *E.coli*, que é um banco de dados mais acurado e com mais sequências depositadas na plataforma de STRING, para a montagem de rede de interações proteicas, identificaram-se mais duas proteínas, sendo elas: *Cystine-binding protein* (FliY; A0A090NDL0) e *Isocitrate dehydrogenase [NADP]* (Icd ; A0A0I3K409), sendo apenas FliY classificada patogênica.

AhpC é classificada como uma alquiperoxidase, sendo responsável pela proteção celular contra danos oxidativos, como a ação de espécies reativas de oxigênio, no entanto, não há dados que relacionados a sua patogênese em *Shigella* spp.

HisJ, GlnH, e FliY são constituintes de transportadores do tipo ABC (ATP - *binding cassette*), já descritos em espécies como *E.coli*, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., sendo responsáveis pelo transporte de aminoácidos como histidina, glutamina e cisteína, respectivamente. Transportadores pertencentes a esta classe já têm sido identificados como fatores de virulência, o que evidencia a exploração destas proteínas como potenciais alvos de antimicrobianos, visto que esta abordagem é escassa para o gênero de *Shigella* (Easton et al. 2006, Han et al. 2011, Suh et al. 2014, Liu et al. 2015, Heuveling et al. 2019).

Tais dados aqui mencionados indicam a carência de informações robustas sobre o gênero de *Shigella* em plataformas de análise proteica, como o STRING, assim como a descrição e interação de proteínas patogênicas detectadas nesta análise.

Portanto, a relevância de dados proteômicos aqui apresentados, referentes a esta espécie, é de fundamental importância para o fornecimento e enriquecimento de dados disponibilizados na literatura, além de propor novos alvos de exploração relacionados à patogênese desta espécie.

7. Conclusão

- A função catalítica predominantemente identificada em ambas às frações extracelulares e intracelulares revelou não apenas a descrição de vias metabólicas essenciais, mas foi capaz de destacar outras funções, como importantes respostas ao estresse biológico, equilíbrio e manutenção para a sobrevivência celular. Principalmente no ambiente hostil, como o trato gastrointestinal;
- O mapeamento da rede de interação biológica de proteínas revelou interações ainda não reportadas na literatura, como a conexão de GlyA à outras proteínas envolvidas em mecanismos de resposta ao estresse biológico;
- A construção das redes de interação de proteínas associadas à predição de proteínas patogênicas permitiu o direcionamento das análises, a fim de promover a discussão sobre possíveis vias celulares que possam estar direta ou indiretamente relacionadas ao fenótipo exibido pela cepa clínica alvo do estudo;
- A identificação e predição de proteínas relacionadas à virulência também trouxe informações sobre esta espécie, uma vez que há carência de dados dessa natureza na literatura, especialmente na região Norte do país;
- A diferença do perfil proteômico entre as cepas, evidenciada pelo diagrama de Venn, forneceu bases para a exploração do perfil exibido pela cepa clínica, pois a mesma já vem sendo extensamente analisada pelo grupo de pesquisa, contribuindo assim para o melhor entendimento do seu fenótipo;
- A maior porção de proteínas classificadas como catalíticas também estão envolvidas em mecanismos de patogênese bacteriana e manutenção celular em diversas espécies, além de possuírem aplicações biotecnológicas já descritas;

- A identificação de diversas proteínas envolvidas na resposta ao estresse biológico indica ser um caminho para futuras investigações, pois esta categoria já tem sido analisada como alvos potenciais de inibição bacteriana;
- Proteínas responsáveis por modificações pós traducionais, como as acetiltransferases, também estão sendo abordados em pesquisas recentes como alvos de investigação de mecanismos da patogênese bacteriana. A acetilação de proteínas está envolvida em atividades como quimiotaxia, invasão celular, replicação, resistência a ácidos, além de processos regulatórios do DNA, modulação de vias metabólicas, estabilidade de proteínas e interações proteicas.
- A caracterização de acetiltransferases e como estas atuam na patogênese de *Shigella* podem esclarecer mecanismos ainda não totalmente compreendidos neste gênero;
- Proteínas precursoras de importantes vias biossintéticas como MetK e AroK, também podem ser alvo de estudos envolvendo inibição bacteriana no gênero de *Shigella*, assim como já é relatado em *E.coli* e outras enterobactérias;
- Mutações em proteínas vesiculares são capazes de modular processos como adaptação, sinalização celular, transferência horizontal de genes e o carregamento de toxinas. Tais mecanismos podem fornecer bases para estratégias de eliminação ou atenuação de virulência bacteriana;
- Foi descrito que a predição de proteínas patogênicas se mostrou maior na cepa clínica e muitas delas já estão envolvidas na patogênese de outras espécies já reportadas na literatura, no entanto, há pouquíssimas informações na espécie alvo da pesquisa;
- A abordagem proteômica se mostrou competente para a identificação de proteínas ainda não descritas na literatura, além de possibilitar a predição e análise de vias envolvidas na patogênese deste microrganismo. Tal abordagem destaca a relevância dos dados apresentados, além de colaborar para a caracterização desta cepa clínica de alto potencial imunogênico, isolada na região.

8. Referências Bibliográficas

- Aebersold, Ruedi; Goodlett DR 2001. Mass spectrometry in proteomics. *Med. Appl. Mass Spectrom.*: 173–194.
- Agaisse H 2016. Molecular and Cellular Mechanisms of *Shigella flexneri* Dissemination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6: 29.
- Álvarez-estrada Á, Gutiérrez-martín CB, Rodríguez-ferri EF, Martínez-martínez S 2018. Transcriptomics of *Haemophilus* (*Glässerella*) *paraus* serovar 5 subjected to culture conditions partially mimetic to natural infection for the search of new vaccine antigens. *BMC Vet. Reseach* 1: 1–11.
- Ambrosi C, Pompili M, Scribano D, Limongi D, Petrucca A, Cannavacciuolo S, Schippa S, Zagaglia C, Grossi M, Nicoletti M 2015. The *Shigella flexneri* OspB effector: An early immunomodulator. *Int. J. Med. Microbiol.* 305: 75–84.
- Anderson JD, Bagamian KH, Muhib F, Amaya MP, Laytner LA, Wierzba T, Rheingans R 2019. Burden of enterotoxigenic *Escherichia coli* and shigella non-fatal diarrhoeal infections in 79 low-income and lower middle-income countries: a modelling analysis. *Lancet Glob. Heal.* 7: e321–e330.
- Anderson M, Sansonetti PJ, Marteyn BS 2016. *Shigella* Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6: 45.
- Angelini M, Stehling EG, Moretti ML, Silveira WD da 2009. Molecular epidemiology of *Shigella* spp strains isolated in two different metropolitan areas of Southeast Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 55: 685–692.
- Arbibe L, Kim DW, Batsche E, Pedron T, Mateescu B, Muchardt C, Parsot C, Sansonetti PJ 2007. An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF- κ B to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat. Immunol.* 8: 47–56.
- Armengaud J 2013. Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! *Environ. Microbiol.* 15: 12–23.
- Arsène-Ploetze F, Bertin PN, Carapito C 2015. Proteomic tools to decipher microbial community structure and functioning. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22: 13599–13612.
- Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH 2017. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J. Chromatogr. Sci.* 55: 182–196.
- Bahrani FK, Sansonetti PJ, Parsot C 1997. Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: Inducer molecules and kinetics of activation. *Infect. Immun.* 65: 4005–4010.
- Banerjee S, Mazumdar S 2012. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the

- Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* 2012: 1–40.
- Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui ABT De, Tajara EH 2012. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 58: 366–375.
- Barducci A, Rios PDL 2015. Non-equilibrium conformational dynamics in the function of molecular chaperones. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 30: 161–169.
- Barer MR 2014. *Bacterial Growth, Culturability and Viability*. Elsevier Ltd.
- Bastos FC, Loureiro ECB 2011. Antimicrobial Resistance of Shigella spp. isolated in the State of Pará, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44: 607–610.
- Bauwens A, Kunsmann L, Zhang W, Karch H, Marejkov M 2017. Intrahost milieu modulates production of outer membrane vesicles , vesicle-associated Shiga toxin 2a and cytotoxicity in Escherichia coli O157 : H7 and O104 : H4. *Environ. Microbiol. Rep.* 9: 626–634.
- Bodnar WM, Blackburn RK, Krise JM, Moseley MA 2003. Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14: 971–979.
- Bonar E, Wojcik I, Jankowska U, Kedracka-Krok S, Bukowski M, Polakowska K, Lis MW, Kosecka-Strojek M, Sabat AJ, Dubin G, Friedrich AW, Miedzobrodzki J, Dubin A, Wladyka B 2016. Identification of Secreted Exoproteome Fingerprints of Highly-Virulent and Non-Virulent Staphylococcus aureus Strains. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6: 51.
- Brotcke Zumsteg A, Goosmann C, Brinkmann V, Morona R, Zychlinsky A 2014. IcsA is a Shigella flexneri adhesion regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. *Cell Host Microbe* 15: 435–445.
- Burmann BM, Wang C, Hiller S 2013. Conformation and dynamics of the periplasmic membrane- protein – chaperone complexes OmpX – Skp and tOmpA – Skp. *Nat. Publ. Gr.* 20: 1265–1272.
- Carabetta VJ, Cristea IM 2017. Regulation, function, and detection of protein acetylation in bacteria. *J. Bacteriol.* 199.
- Carayol N, Nhieu GT Van 2013. The inside story of shigella invasion of intestinal epithelial cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3.
- Castaño-cerezo S, Bernal V, Post H, Fuhrer T, Cappadona S, Nerea C 2014. Protein acetylation affects acetate metabolism , motility and acid stress response in Escherichia coli. *Mol. Syst. Biol.:* 1–15.
- Cecil JD, Sirisaengtaksin N, Marie A, Cooperative H, Genetics M 2019. Outer Membrane Vesicle—Host Cell Interactions. *Microbiol. Spectr.* 7: 8–11.
- Chain O 2018. Cross-Protective Shigella Whole-Cell Vaccine With a Truncated. *Front. Microbiol.* 9: 1–11.

- Chang T, Lin Y, Wang C, Liao Y 2012. Outer Membrane Lipoprotein Lpp Is Gram-negative Bacterial Cell Surface Receptor for Cationic Antimicrobial Peptides *
□. *J. Biol. Chem.* 287: 418–428.
- Chekabab, Samuel Mohammed Jubelin G, Dozois CM, Harel J 2014. PhoB Activates Escherichia coli O157: H7 Virulence Factors in Response to Inorganic Phosphate Limitation. *PLoS One* 9.
- Chekabab SM, Harel J, Dozois CM 2014. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence*: 786–793.
- Chen Y, Liu L, Fu H, Wei C, Jin Q 2014. Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from Shigella flexneri under different culture conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453: 696–702.
- Christie-Oleza JA, Armengaud J 2010. In-depth analysis of exoproteomes from marine bacteria by shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry: The Ruegeria pomeroyi DSS-3 case-study. *Mar. Drugs* 8: 2223–2239.
- Cournia Z, Allen TW, Andricioaei I, Antony B, Baum D, Buchete N-V, Deckman JT, Delemotte L 2016. Perspective from Experiments and Membrane Protein Structure, Function and Dynamics: A Perspective from Experiments and Theory. *J Membr Biol* 248: 611–640.
- Cowles CE, Li Y, Semmelhack MF, Cristea IM, Silhavy TJ 2011. The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 79: 1168–1181.
- Cox J, Mann M 2007. Is Proteomics the New Genomics? *Cell* 130: 395–398.
- Cruz CBN Da, Souza MCS De, Serra PT, Santos I, Balieiro A, Pieri FA, Nogueira PA, Orlandi PP 2014. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. *Biomed Res. Int.* 2014.
- Dantas PI de S 2016. Variabilidade genética dos principais fatores de virulência em amostras Clínicas de Shigella flexneri.
- Das JK, Tripathi A, Ali A, Hassan A, Dojoseandy C, Bhutta ZA 2013. Vaccines for the prevention of diarrhea due to cholera , shigella , ETEC and rotavirus. *BMC Public Health* 13: S11.
- Desvaux M, Hébraud M, Talon R, Henderson IR 2009. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* 17: 139–145.
- Doherty MK, Whitfield PD 2011. Proteomics moves from expression to turnover. *Expert Rev. Proteomics* 8: 325–334.
- Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T 2016. The world of protein acetylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1864: 1372–1401.

- Easton JA, Thompson P, Crowder MW 2006. Time-dependent Translational Response of *E. coli* to Excess Zn(II). *J. Biomol. Tech.* 17: 303–307.
- Eletsky A, Michalska K, Houliston S, Zhang Q, Daily MD, Xu X, Cui H, Yee A, Lemak A, Wu B, Garcia M, Burnet MC, Meyer KM, Aryal UK, Sanchez O, Ansong C, Xiao R, Acton TB, Adkins JN, Montelione GT, Joachimiak A, Arrowsmith CH, Savchenko A, Szyperski T, Cort JR 2014. Structural and Functional Characterization of DUF1471 Domains of Salmonella Proteins SrfN , YdgH / SssB , and YahO. *PLoS One* 9.
- Enjalbert B, Millard P, Dinclaux M, Portais J, Létisse F 2017. Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Nat. Publ. Gr.*: 1–11.
- Entzminger KC, Chang C, Myhre RO, McCallum KC, Maynard JA 2013. The Skp chaperone helps fold soluble proteins in vitro by inhibiting aggregation*. *Biochemistry* 51: 4822–4834.
- Ernst DC, Downs DM 2016. 2-Aminoacrylate Stress Induces a Context-Dependent Glycine Requirement in *ridA* Strains of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 198: 536–543.
- Faherty CS et al. 2012. *Shigella flexneri* Effectors OspE1 and OspE2 Mediate Induced Adherence to the Colonic Epithelium Following Bile Salts Exposure. *Mol. Microbiol.* 85: 213–223.
- Faherty C, Harper JM, Shea-Donohue T, Barry EM, Kaper JB, Fasano A, Nataro JP 2012. Chromosomal and Plasmid-Encoded Factors of *Shigella flexneri* Induce Secretogenic Activity Ex Vivo. *PLoS One* 7.
- Fasano A, Noriega FR, Maneval DR, Chanasongcram S, Russell R, Guandalini S, Levine MM 1995. *Shigella enterotoxin 1*: An enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest.* 95: 2853–2861.
- Fei YY, Bhat JA, Zhang YY, Amin GM AI, Gai JY 2018. Complex gene response of herbicide-resistant *Enterobacter* strain NRS- 1 under different glyphosate stresses. *3 Biotech* 0: 0.
- Flynn JM, Christopherson MR, Downs DM 2013. Decreased coenzyme A levels in *ridA* mutant strains of *Salmonella enterica* result from inactivated serine hydroxymethyltransferase. *Mol. Microbiol.* 89: 751–759.
- Gallego-jara J, Ana E, Bernal V, Castan S, Iborra L, Ca M, Diego T De 2014. Regulation of bacterial physiology by lysine acetylation of proteins. *N. Biotechnol.* 31.
- Gaynor M, Mankin AS 2003. Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 949–960.
- Gerding MA, Ogata Y, Pecora ND, Niki H, Strains G, Strains G 2015. The trans-

- envelope Tol–Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 63: 1008–1025.
- Gouveia MJ, Brindley PJ, Santos LL, Manuel J, Gomes P, Vale N, Herculano RA 2014. Metabolites As Potential Disease Biomarkers : a Review. *Metabolism* 62: 1206–1217.
- Green, Erin R.; Mecsas J 2016. Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiol. Spectr.* 4: 1–32.
- Gummesson B, Beli P, Weinert BT, Iesmantavicius V, Wagner SA, Scho C, Nystro T 2013. Short Article Acetyl-Phosphate Is a Critical Determinant of Lysine Acetylation in *E. coli*. *Mol. Cell*: 265–272.
- Gupta A, Kapil R, Dhakan DB, Sharma VK 2014. MP3 : A Software Tool for the Prediction of Pathogenic Proteins in Genomic and Metagenomic Data. *PLoS One* 9.
- Han MJ, Lee JW, Lee SY 2011. Understanding and engineering of microbial cells based on proteomics and its conjunction with other omics studies. *Proteomics* 11: 721–743.
- Hartl FU, Bracher A, Hayer-hartl M 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324.
- Hasin Y, Seldin M, Lusic A 2017. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* 18: 83.
- Heberle H, Meirelles GV, Silva FR, Telles GP, Minghim R 2015. InteractiVenn : a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16: 169.
- Heine SJ, Diaz-McNair J, Andar AU, Drachenberg CB, Verg L van de, Walker R, Picking WL, Pasetti MF 2014. Intradermal Delivery of Shigella IpaB and IpaD Type III Secretion Proteins: Kinetics of Cell Recruitment and Antigen Uptake, Mucosal and Systemic Immunity, and Protection across Serotypes. *J. Immunol.* 192.
- Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67: 5587–5596.
- Henry T, Pommier S, Journet L, Bernadac A, Gorvel J, Llobès R 2004. Improved methods for producing outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Res* 155: 437–446.
- Hermanson G. 2013. Enzyme Modification and Conjugation. In: *Bioconjugate Techniques*,, pp. 951–957.
- Heuveling J, Landmesser H, Schneider E 2019. Evidence from mutational analysis

- for a single transmembrane substrate binding site in the histidine ATP-binding cassette transporter of salmonella enterica serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 201.
- Hisham Y, Ashhab Y 2018. Identification of Cross-Protective Potential Antigens against Pathogenic *Brucella* spp . through Combining Pan-Genome Analysis with Reverse Vaccinology. *J. Immunol. Res.* 2018.
- Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, Tai HL 2003. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin. Biochem.* 24: 3–12.
- Horvatic A, Kules J, Guillemin N, Galan A, Mrljak V, Bhide M 2016. High-throughput proteomics and the fight against pathogens. *Mol. Biosyst.* 12: 2373–2384.
- Hrafn G, Bergman P, Andersson J, Raqib R, Agerberth B 2010. Battle and balance at mucosal surfaces – The story of *Shigella* and antimicrobial peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396: 116–119.
- Husain Q 2010. β Galactosidases and their potential applications : a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 41–62.
- Intelicato-Young J, Fox A 2013. Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 92: 381–386.
- Jennison A V., Verma NK 2004. *Shigella flexneri* infection: Pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 43–58.
- Jha V, Tikariha H, Dafale NA, Purohit HJ 2018. Exploring the rearrangement of sensory intelligence in proteobacteria: insight of Pho regulon. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 0: 0.
- Karlsson R, Gonzales-Siles L, Boulund F, Svensson-Stadler L, Skovbjerg S, Karlsson A, Davidson M, Hulth S, Kristiansson E, Moore ERB 2015. Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms - A prospectus. *Syst. Appl. Microbiol.* 38: 246–257.
- Kästner J, Peter H, Hänel F 2015. Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during calf infection with *Chlamydia psittaci*. *Int. J. Med. Microbiol.* 305: 310–321.
- Kaur K, Chatterjee S, Guzman RN De 2016. Characterization of the *Shigella* and *Salmonella* Type III Secretion System Tip – Translocon Protein – Protein Interaction by Paramagnetic Relaxation Enhancement. *ChemBioChem* 17: 745–752.
- Kidwai AS, Mushamiri I, Niemann GS, Brown RN, Adkins JN, Heffron F 2013. Diverse Secreted Effectors Are Required for *Salmonella* Persistence in a Mouse Infection Model. *PLoS One* 8: 1–10.

- Killackey SA, Sorbara MT, Girardin SE 2016. Cellular Aspects of Shigella Pathogenesis: Focus on the Manipulation of Host Cell Processes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6: 38.
- Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C 2010. Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe* 8: 20–35.
- Konradt C, Frigimelica E, Nothelfer K, Puhar A, Salgado-Pabon W, Bartolo V Di, Scott-Algara D, Rodrigues CD, Sansonetti PJ, Phalipon A 2011. The Shigella flexneri type three secretion system effector IpgD inhibits T cell migration by manipulating host phosphoinositide metabolism. *Cell Host Microbe* 9: 263–272.
- Korndörfer IP, Dommel MK, Skerra A 2004. Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 1015–1020.
- Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque ASG, Zaidi AKM, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omere R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *Lancet* 382: 209–222.
- Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM 2017. Shigellosis. *Lancet* 6736.
- Kucharova V, Wiker HG 2014. Proteogenomics in microbiology: Taking the right turn at the junction of genomics and proteomics. *Proteomics* 14: 2360–2675.
- Kulp A, Kuehn MJ 2012. Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.*: 163–184.
- Lan X, Wang W, Li Q, Wang J 2016. The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. *Mol. Neurobiol.* 53: 1794–1801.
- Li L, Wang W, Zhang R, Xu J, Wang R, Wang L, Zhao X 2018. First acetyl-proteome profiling of Salmonella Typhimurium revealed involvement of lysine acetylation in drug resistance. *Vet. Microbiol.* 226: 1–8.
- Liu X, Lu L, Liu X, Liu X, Pan C, Feng E, Wang D, Niu C, Zhu L, Wang H 2017. Proteomic analysis of shigella virulence effectors secreted under different conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 171–178.
- Liu X, Lu L, Liu X, Pan C, Feng E, Wang D, Zhu L, Wang H 2015. Comparative proteomics of Shigella flexneri 2a strain 301 using a rabbit ileal loop model

- reveals key proteins for bacterial adaptation in host niches. *Int. J. Infect. Dis.* 40: 28–33.
- Livio S, Strockbine NA, Panchalingam S, Tennant SM, Barry EM, Marohn ME, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng JB, Oundo JO, Qureshi S, Ramamurthy T, Tamboura B, Adegbola RA, Hossain MJ, Saha D, Sen S, Faruque ASG, Alonso PL, Breiman RF, Zaidi AKM, Sur D, Sow SO, Berkeley LY, O'Reilly CE, Mintz ED, Biswas K, Cohen D, Farag TH, Nasrin D, Wu Y, Blackwelder WC, Kotloff KL, Nataro JP, Levine MM 2014. Shigella isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clin. Infect. Dis.* 59: 933–941.
- Luz DE, Nepomuceno RSL, Spira B, Ferreira RCC 2012. The Pst system of *Streptococcus mutans* is important for phosphate transport and adhesion to abiotic surfaces. *Mol. Oral Microbiol.* 27: 172–181.
- Ma W, Zhang D, Li G, Liu J, He G, Zhang P, Yang L, Zhu H, Xu N, Liang S 2017. Antibacterial mechanism of daptomycin antibiotic against *Staphylococcus aureus* based on a quantitative bacterial proteome analysis. *J. Proteomics* 150: 242–251.
- Madigan M, Martinko J, Bender K 2016. *Microbiologia de Brock*.
- Maffei B, Francetic O, Subtil A 2017. Tracking Proteins Secreted by Bacteria: What's in the Toolbox? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7: 1–17.
- Mani S, Wierzba T, Walker RI 2016. Status of vaccine research and development for Shigella. *Vaccine* 34.
- Marman HE, Mey AR, Payne SM 2014. Elongation factor P and modifying enzyme PoxA are necessary for virulence of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 82: 3612–3621.
- Marteyn B, Gazi A, Sansonetti P 2012. Shigella. *Gut Microbes* 3: 104–120.
- Martinez-Martin N 2017. Technologies for Proteome-Wide Discovery of Extracellular Host-Pathogen Interactions. *J. Immunol. Res.* 2017: 2197615.
- Mattock E, Blocker AJ 2017. How Do the Virulence Factors of Shigella Work Together to Cause Disease? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7: 1–24.
- Melton-Celsa AR 2014. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol. Spectr.* 2: 1–21.
- Ménard R, Dehio C, Sansonetti PJ 1996. Bacterial entry into epithelial cells: The paradigm of Shigella. *Trends Microbiol.* 4: 220–226.
- Mi H, Muruganujan A, Huang X, Ebert D, Mills C, Guo X, Thomas PD 2019. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat. Protoc.* 14: 703–721.
- Mir R, Jallu S, Singh TP 2013. The shikimate pathway: Review of amino acid

- sequence , function and three-dimensional structures of the enzymes. *Crit. Rev. Microbiol.* 7828: 1–18.
- Mota LJ, Sorg I, Cornelis GR 2005. Type III secretion: The bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiol. Lett.* 252: 1–10.
- Nagar SD, Aggarwal B, Joon S, Bhatnagar R, Bhatnagar S 2016. A Network Biology Approach to Decipher Stress Response in Bacteria Using Escherichia coli As a Model. *J. Integr. Biol.* 20: 310–324.
- Naz A, Awan FM, Obaid A, Muhammad SA, Paracha RZ, Ahmad J, Ali A 2015. Identification of putative vaccine candidates against Helicobacter pylori exploiting exoproteome and secretome: A reverse vaccinology based approach. *Infect. Genet. Evol.* 32: 280–291.
- Ndungo E, Kotloff KL, Chakraborty S, Mani S, Rasko DA, Pasetti F 2018. A Novel Shigella Proteome Microarray Discriminates Targets of Human Antibody Reactivity following Oral Vaccination and Experimental Challenge. *mSphere* 3: 1–14.
- Nesvizhskii AI, Aebersold R 2005. Interpretation of Shotgun Proteomic Data. *Mol. Cell. Proteomics* 4: 1419–1440.
- Niebuhr K, Giuriato S, Pedron T, Philpott DJ, Gaits F, Sable J, Sheetz MP, Parsot C, Sansonetti PJ, Payrastre B 2002. Conversion of PtdIns(4, 5)P₂ into PtdIns(5)P by the S.flexneri effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J.* 21: 5069–5078.
- Niemann GS, Brown RN, Gustin JK, Stufkens A, Shaikh-kidwai AS, Li J, Mcdermott JE, Brewer HM, Schepmoes A, Smith RD, Adkins JN, Heffron F, Mmun INI 2011. Discovery of Novel Secreted Virulence Factors from Salmonella enterica Serovar Typhimurium by Proteomic Analysis of. *Infect. Immun.* 79: 33–43.
- Njamkepo E, Fawal N, Tran-Dien A, Hawkey J, Strockbine N, Jenkins C, Talukder KA, Bercion R, Kuleshov K, Kolínská R, Russell JE, Kaftyreva L, Accou-Demartin M, Karas A, Vandenberg O, Mather AE, Mason CJ, Page AJ, Ramamurthy T, Bizet C, Gamian A, Carle I, Sow AG, Bouchier C, Wester AL, Lejay-Collin M, Fonkoua M-C, Hello S Le, Blaser MJ, Jernberg C, Ruckly C, Mérens A, Page A-L, Aslett M, Roggentin P, Fruth A, Denamur E, Venkatesan M, Bercovier H, Bodhidatta L, Chiou C-S, Clermont D, Colonna B, Egorova S, Pazhani GP, Ezernitchi A V., Guigon G, Harris SR, Izumiya H, Korzeniowska-Kowal A, Lutyńska A, Gouali M, Grimont F, Langendorf C, Marejková M, Peterson LAM, Perez-Perez G, Ngandjio A, Podkolzin A, Souche E, Makarova M, Shipulin GA, Ye C, Žemličková H, Herpay M, Grimont PAD, Parkhill J, Sansonetti P, Holt KE, Brisse S, Thomson NR, Weill F-X 2016. Global phylogeography and evolutionary history of Shigella dysenteriae type 1. *Nat. Microbiol.*: 16027.
- Noga EJ, Silphaduang U, Park NG, Seo JK, Stephenson J, Kozłowicz S 2009. Comparative Biochemistry and Physiology , Part B Piscidin 4 , a novel

- member of the piscidin family of antimicrobial peptides. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 152: 299–305.
- O’Ryan M, Vidal R, Canto F Del, Salazar JC, Montero D 2015. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for Shigella, Salmonella, enterotoxigenic E. Coli (ETEC) enterohemorrhagic E. Coli (EHEC) and Campylobacter jejuni. *Hum. Vaccines Immunother.* 11: 601–619.
- Ochoa TJ, Chea-Woo E, Baiocchi N, Pecho I, Campos M, Prada A, Valdiviezo G, Lluque A, Lai D, Cleary TG 2013. Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children. *J. Pediatr.* 162: 349–356.
- Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C 2005. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science (80-)*. 307: 727–731.
- Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Pereira da Silva LH 2006. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 39: 507–517.
- Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JME, Mars-Groenendijk RH, Trip H, Molhoek EM, Jansen HJ, Plas J van der, Jong AL de, Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Speksnijder AGCL 2015. Rapid and reliable discrimination between Shigella species and Escherichia coli using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Med. Microbiol.* 305: 446–452.
- Pahil S, Taneja N, Rahman H, Raghava GPS 2017. In silico analysis to identify vaccine candidates common to multiple serotypes of Shigella and evaluation of their immunogenicity. *PLoS One* 12: 1–26.
- Pal P 2014. Modern aspects on Shigella pathogenicity and vaccine development - A Review. *Int. Lett. Nat. Sci.* 12: 12–20.
- Park S, Jeon E, Lee S, Lee J, Lee T, Won J 2012. An analysis of the concentration change of intermediate metabolites by gene manipulation in fatty acid biosynthesis. *Enzyme Microb. Technol.* 51: 95–99.
- Parsot C 2009. Shigella type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes? *Curr. Opin. Microbiol.* 12: 110–116.
- Pastor Y, Camacho A, Gil AG, Ramos R, López De Ceráin A, Peñuelas I, Irache JM, Gamazo C 2017. Effective protection of mice against Shigella flexneri with a new self-adjuvant multicomponent vaccine. *J. Med. Microbiol.* 66: 946–958.
- Peirano G, Santos Souza F Dos, Prazeres Rodrigues D Dos, Proeitti A, Camilo C, Cosme LMSS, Fontana CK, Rodrigues DS, Miralles IS, Cavalcante VO, Souza MDPAH, Huf HMR, Gomes M, Coelho M, Lourenço MC 2006. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in Shigella spp. from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 245–250.

- Peirs P, Lefe P, Boarbi S, Wang X, Denis O, Braibant M, Pethe K, Locht C, Huygen K, Content J 2005. Mycobacterium tuberculosis with Disruption in Genes Encoding the Phosphate Binding Proteins PstS1 and PstS2 Is Deficient in Phosphate Uptake and Demonstrates Reduced In Vivo Virulence. *Infect. Immun.* 73: 1898–1902.
- Pieper R, Fisher CR, Suh MJ, Huang ST, Parmar P, Payne SM 2013. Analysis of the proteome of intracellular shigella flexneri reveals pathways important for intracellular growth. *Infect. Immun.* 81: 4635–4648.
- Pizarro-cerdá J, Charbit A, Enninga J, Lafont F 2016. Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens Listeria , Francisella , Shigella and Yersinia. *Semin. Cell Dev. Biol.* 60: 155–167.
- Poetsch A, Wolters D 2008. Bacterial membrane proteomics. *Proteomics* 8: 4100–4122.
- Poole K 2012. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*: 2069–2089.
- Pore D, Mahata N, Pal A, Chakrabarti MK 2011. Outer Membrane Protein A (OmpA) of Shigella flexneri 2a , Induces Protective Immune Response in a Mouse Model. *PLoS One* 6.
- Purdy GE, Fisher CR, Payne SM 2007. IcsA surface presentation in Shigella flexneri requires the periplasmic chaperones DegP, Skp, and SurA. *J. Bacteriol.* 189: 5566–5573.
- Qadri F, Hossain SA, Ciznár I, Haider K, Ljungh A, Wadstrom T, Sack DA 1988. Congo red binding and salt aggregation as indicators of virulence in Shigella species. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1343–1348.
- Radford D, Strange P, Lepp D, Hernandez M, Rehman MA, Diarra MS, Balamurugan S 2018. Genomic and proteomic analyses of Salmonella enterica serovar Enteritidis identifying mechanisms of induced de novo tolerance to ceftiofur. *Front. Microbiol.* 9: 1–20.
- Ram PK, Crump JA, Gupta SK, Miller MA, Mintz ED 2008. Part II. Analysis of data gaps pertaining to Shigella infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. *Epidemiol. Infect.* 136: 436–448.
- Ren J, Sang Y, Lu J, Yao Y 2017. Protein Acetylation and Its Role in Bacterial Virulence. *Trends Microbiol.* xx: 1–12.
- Ren J, Sang Y, Qin R, Su Y, Cui Z, Mang Z, Li H, Lu S, Zhang J, Cheng S, Liu X, Li J, Lu J, Wu W 2019. Metabolic intermediate acetyl phosphate modulates bacterial virulence via acetylation. *Emerg. Microbes Infect.* 1751.
- Rezwan M, Grau T, Tschumi A, Sander P 2007. Lipoprotein synthesis in mycobacteria. *Microbiology* 153: 652–658.

- Rigel NW, Silhavy TJ 2012. Making a beta barrel: Assembly of Outer Membrane Proteins in Gram negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 15: 189–193.
- Rocha F, Barcelos T, Faria N 2016. Avaliação Microbiológica e Microscópica do Caldo de Cana Comercializado em Ji-Paraná. *Ensaio e Ciência Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* 20: 111–115.
- Rolfo F, Marin GH, Silberman M, Pattin J, Giugnio S, Gatti B, Bettiol M, Rigoni A 2012. Epidemiological study of shigellosis in an urban area of Argentina. *J. Infect. Dev. Ctries.* 6: 324–328.
- Rowley G, Skovierova H, Stevenson A, Rezuchova B, Homerova D, Lewis C, Sherry A, Kormanec J, Roberts M 2011. The periplasmic chaperone Skp is required for successful Salmonella Typhimurium infection in a murine typhoid model. *Microbiology* 157: 848–858.
- Runyen-Janecky LJ, Boyle AM, Kizzee A, Liefer L, Payne SM 2005. Role of the Pst System in Plaque Formation by the Intracellular Pathogen Shigella flexneri. *Infect. Immun.* 73: 1404–1410.
- Runyen-Janecky LJ, Payne SM 2002. Identification of Chromosomal Shigella flexneri Genes Induced by the Eukaryotic Intracellular Environment. *Infect. Immun.* 70: 4379–4388.
- Sanchez L 2001. TCA protein precipitation protocol. *October.* 2001–2001.
- Sankaran K, Ramachandran V, Subrahmanyam YVBK, Rajarathnam S, Elango S, Roy RK 1989. Congo red-mediated regulation of levels of Shigella flexneri 2a membrane proteins. *Infect. Immun.* 57: 2364–2371.
- Santos TMA, Lin T, Rajendran M, Anderson SM, Weibel DB 2014a. Polar localization of Escherichia coli chemoreceptors requires an intact Tol–Pal complex. *Mol. Microbiol.* 92: 985–1004.
- Santos TMA, Lin T, Rajendran M, Anderson SM, Weibel DB 2014b. Polar localization of Escherichia coli chemoreceptors requires an intact Tol – Pal complex. *Mol. Microbiol.* 92: 985–1004.
- Sarker P, Ahmed S, Tiash S, Rekha RS, Stromberg R, Bergman P, Gudmundsson GH, Agerberth B, Raqib R 2011. Phenylbutyrate Counteracts Shigella Mediated Downregulation of Cathelicidin in Rabbit Lung and Intestinal Epithelia : A Potential Therapeutic Strategy. *PLoS One* 6.
- Schauer O, Mostaghaci B, Colin R, Hürtgen D, Kraus D, Sitti M, Sourjik V 2018. Motility and chemotaxis of bacteria-driven microswimmers fabricated using antigen 43-mediated biotin display. *Sci. Rep.:* 1–11.
- Schneider BL, Hernandez VJ, Reitzer L 2013. Putrescine Catabolism is a Metabolic Response to Several Stresses in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 88: 537–550.

- Schroeder GN, Hilbi H 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 134–156.
- Scribano D, Damico R, Ambrosi C, Superti F, Marazzato M, Conte MP, Longhi C, Palamara AT, Zagaglia C, Nicoletti M 2016. The *Shigella flexneri* OmpA amino acid residues 188 EVQ 190 are essential for the interaction with the virulence factor PhoN2. *Biochem. Biophys. Reports* 8: 168–173.
- Serra PT 2013. Análise investigativa dos fatores de virulência de cepas selvagens de *Shigella* spp. in vivo e seu potencial inflamatório.
- Shahbaaz M, Bisetty K, Ahmad F, Hassan I 2016. Current Advances in the Identification and Characterization of Putative Drug and Vaccine Targets in the Bacterial Genomes. *Curr. Top. in Medicinal Chem.* 16: 1040–1069.
- Shashkov AS, Senchenkova SN, Sun Q, Lan R, Wang J, Perepelov A V., Knirel YA, Xu J 2013. Structure of the O-antigen of a novel *Shigella flexneri* serotype, 1d (I: 7,8). *Carbohydr. Res.* 373: 93–96.
- Shi S, Chen Y, Siewers V, Nielsen J 2014. Improving Production of Malonyl Coenzyme A-Derived Metabolites by Abolishing Snf1-Dependent Regulation of Acc1. *MBio* 5: 1–8.
- Sidik S, Kottwitz H, Benjamin J, Ryu J, Jarrar A, Garduno R, Rohde JR 2014. A *Shigella flexneri* Virulence Plasmid Encoded Factor Controls Production of Outer Membrane Vesicles. *G3: Genes/Genomes/Genetics* 4: 2493–2503.
- Smith DGE, Goldstone RJ, Inglis NF, Watson E 2014. *Bacterial Proteomics in the Study of Virulence: An Overview*. Elsevier Ltd.
- Snider CA, Voss BJ, McDonald WH, Cover TL 2016. Growth phase-dependent composition of the *Helicobacter pylori* exoproteome. *J. Proteomics* 130: 94–107.
- Soufi B, Soares NC, Ravikumar V, Macek B 2012. Proteomics reveals evidence of cross-talk between protein modifications in bacteria : focus on acetylation and phosphorylation. *Curr. Opin. Microbiol.* 15: 357–363.
- Sousa MÂB, Mendes EN, Collares GB, Amedée Péret-Filho L, José Penna F, Prazeres Magalhães P 2013. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108: 30–35.
- Sperandio B, Fischer N, Chevalier-Curt MJ, Rossez Y, Roux P, Masselot CR, Sansonetti PJ 2013. Virulent *shigella flexneri* affects secretion, expression, and glycosylation of gel-forming mucins in mucus-producing cells. *Infect. Immun.* 81: 3632–3643.
- Suh MJ, Kuntumalla S, Yu Y, Pieper R 2014. Proteomes of pathogenic *Escherichia coli*/*Shigella* group surveyed in their host environments. *Expert Rev.*

Proteomics 11: 593–609.

- Sun T, Li S, Song X, Pei G, Diao J, Cui J, Shi M 2018. Biotechnology for Biofuels Re - direction of carbon flux to key precursor malonyl - CoA via artificial small RNAs in photosynthetic *Synechocystis* sp . PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels*: 1–16.
- Szkłarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Müller J, Bork P, Jensen LJ, Mering C Von 2011. The STRING database in 2011: Functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* 39: 561–568.
- Teo I, Toms SM, Marteyn B, Barata TS, Simpson P, Johnston KA, Schnupf P, Puhar A, Bell T, Tang C, Zloh M, Matthews S, Rendle PM, Sansonetti PJ, Shaunak S 2012. Preventing acute gut wall damage in infectious diarrhoeas with glycosylated dendrimers. *EMBO Mol. Med.* 4: 866–881.
- Thanh T, Thanh T, Lee S, Rhee D 2014. Adenylate kinase from *Streptococcus pneumoniae* is essential for growth through its catalytic activity. *FEBS Open Bio* 4: 672–682.
- The HC, Thanh DP, Holt KE, Thomson NR, Baker S 2016. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 235–250.
- Thomas PD, Kejariwal A, Campbell MJ, Mi H, Diemer K, Guo N, Ladunga I, Ulitsky-Lazareva B, Muruganujan A, Rabkin S, Vandergriff JA, Doremieux O 2003. PANTHER: A browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res.* 31: 334–341.
- Tsai MLWHS 2017. Improvement of shikimic acid production in *Escherichia coli* with growth phase-dependent regulation in the biosynthetic pathway from glycerol. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 25.
- Turbyfill KR, Clarkson KA, Vortherms AR, Oaks E V., Kaminski RW 2018. Assembly, Biochemical Characterization, Immunogenicity, Adjuvanticity, and Efficacy of *Shigella* Artificial Invaplex. *mSphere* 3: 1–18.
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Publ. Gr.* 11: 777–788.
- UNICEF 2013. *Committing to Child Survival : A Promise Renewed. 2013 Progress Report.* New York.
- VerBerkmoes NC, Connelly HM, Pan C, Hettich RL 2004. Mass spectrometric approaches for characterizing bacterial proteomes. *Expert Rev. Proteomics* 1: 433–447.
- Viller Alerte SC, Janepsy Díaz T, Jeannette Vollaie Z, Espinoza M ME, Solari G V, Cerda L J, Torres H M 2012. Foodborne disease outbreaks around the urban

- Chilean areas from 2005 to 2010. *Rev. Chil. infectología* 29: 26–31.
- Vo JL, Mart GC 2017. Autotransporter Adhesins in Escherichia coli Pathogenesis. *Proteomics* 1600431: 1–10.
- Walker CLF, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, O'Brien KL, Campbell H, Black RE 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 381: 1405–1416.
- Walton TA, Sousa MC 2004. Crystal Structure of Skp , a Prefoldin-like Chaperone that Protects Soluble and Membrane Proteins from Aggregation. *Mol. Cell* 15: 367–374.
- Wang S, Arends SJR, Weiss DS, Newman EB 2005. A deficiency in S-adenosylmethionine synthetase interrupts assembly of the septal ring in Escherichia coli K-12. *Mol. Microbiol.* 58: 791–799.
- Wang X, Jiang F, Zheng J, Chen L, Dong J, Sun L, Zhu Y, Liu B, Yang J, Yang G, Jin Q 2016a. The outer membrane phospholipase A is essential for membrane integrity and type III secretion in Shigella flexneri. *Open Biol.* 6.
- Wang DZ, Kong LF, Li YY, Xie ZX 2016b. Environmental microbial community proteomics: Status, challenges and perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1–20.
- Weirich J, Bräutigam C, Mühlenkamp M, Franz-Wachtel M, Macek B, Meuskens I, Skurnik M, Leskinen K, Bohn E, Autenrieth I, Schütz M 2017. Identifying components required for OMP biogenesis as novel targets for anti-infective drugs. *Virulence* 8: 1170–1188.
- WHO 2014. World Health statistics 2014. *World Heal. Organ.:* 180.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL 1996. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13: 19–50.
- Wolfe AJ 2005. The Acetate Switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 12–50.
- Woude MW Van Der, Henderson IR 2008. Regulation and Function of Ag43 (Flu). *Annu. Rev. Microbiol.* 62: 153–159.
- Wu S, Ge X, Lv Z, Zhi Z, Chang Z, Zhao XS 2011. Interaction between bacterial outer membrane proteins and periplasmic quality control factors: a kinetic partitioning mechanism. *Biochem. J.* 511: 505–511.
- Xingming Liu, Lilan Lu, Xinrui Liu, Xiankai Liu, Chao Pan, Erling Feng, Dongshu Wang, Chang Niu, Li Zhu HW 2006. Proteomic analysis of Shigella virulence effectors secreted under different conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.*
- Yang Y, Lin Y, Li L, Robert J, Yan Y 2015. Regulating malonyl-CoA metabolism via synthetic antisense RNAs for enhanced biosynthesis of natural products. *Metab. Eng.* 29: 217–226.

- Yoshida S, Handa Y, Suzuki T, Ogawa M, Suzuki M, Tamai A, Abe, Katayama E, Sasakawa C 2006. Microtubule-Severing Activity of Shigella Is Pivotal for Intercellular Spreading. *Science* (80-.). 314: 985–989.
- Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Cenk Sahinalp S, Ester M, Foster LJ, Brinkman FSL 2010. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26: 1608–1615.
- Yu K, Wang Z, Zhou F, Jiang J, Liu Y, Hu M, Liu X 2017. Quantitative analysis of Shigella flexneri protein expression under acid stress. *Proteomics*: 1–34.
- Z. W. El-Hajj RR-L and EBN 2013. Cell division , one-carbon metabolism and methionine synthesis in a metK -deficient Escherichia coli mutant , and a role for MmuM. *Microbiology* 159: 2036–2048.
- Zaidi MB, Estrada-García T 2014. Shigella: A Highly Virulent and Elusive Pathogen. *Curr. Trop. Med. reports* 1: 81–87.
- Zhang X, Li Y, Wang W, Zhang J, Lin Y, Hong B, You X, Song D, Wang Y, Jiang J, Si S 2018. Identification of an anti-Gram-negative bacteria agent disrupting the interaction between LPS transporters LptA and LptC. *Int. J. Antimicrob. Agents*.
- Zückert WR 2014. Secretion of Bacterial Lipoproteins: Through the Cytoplasmic Membrane, the Periplasm and Beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843: 1509–1516.
- Zurawski D V., Mitsuhashi C, Mummy KL, McCormick BA, Maurelli AT 2006. OspF and OspC1 are Shigella flexneri type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence. *Infect. Immun.* 74: 5964–5976.

9. Apêndice

Tabela 10: Proteínas extracelulares diferenciais em meio LB identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201

ID	Nomenclatura	Processo celular	Localização celular
A0A090N LW4	Aconitatehidratase 2	tricarboxylicacidcycle	Citoplasma
I6HBN0	Aminotransferase	biosyntheticprocess ;cellular amino acidmetabolicprocess	Citoplasma

A0A090N WR7	Fructose- biphosphatealdolase	glycolyticprocess	Citoplas ma
I6HBB7	Transaldolase	carbohydratemetabolicproce ss ; pentose-phosphate shunt	Citoplas ma
A0A090N FX2	Phenylalanine--tRNAligase alpha subunit	phenylalanyl- tRNAaminoacylation	Citoplas ma
I6H561	OutermembraneporinproteinO mpD	iontransport	Membran a extracelul ar
A0A090N NX7	Putrescine- bindingperiplasmicprotein	polyaminetransport	Periplas ma
A0A090N D83	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	fattyacidbiosyntheticprocess	Membran a citoplasm ática
A0A090N G72	Probabletranscriptionalregulat oryproteinYebC	regulationoftranscription, DNA-templated ;transcription, DNA- templated	Citoplas ma
A0A090N LI6	Aspartatecarbamoyltransferas e	de novo' pyrimidinenucleobasebiosyn theticprocess; 'de novo' UMP biosyntheticprocess; cellular amino acidmetabolicprocess	Citoplas ma
A0A090N KC5	Glutathione S-transferase	-	Citoplas ma
A0A090N ER1	UncharacterizedproteinYggE	-	Periplas ma
A0A090N FG2	Periplasmic metal bindingprotein	celladhesion; metal iontransport	Periplas ma
A0A090N LF6	Ribosome-recyclingfactor (RRF)	translationaltermination	Citoplas ma
A0A010K L72	Phosphoheptoseisomerase	carbohydratemetabolicproce ss ; D-glycero-D-manno- heptose 7-phosphate biosyntheticprocess	Citoplas ma
A0A090N EF2	DNA protectionduringstarvationprot ein	cellularironionhomeostasis ;chromosomecondensation; response to stress	Citoplas ma
A0A090N W82	UPF0234 proteinYajQ	-	Citoplas ma

A0A090N ET6	Peptidoglycan-associated lipoprotein	-	Membrana extracellular
A0A090N XN3	30S ribosomal protein S7	translation	Citoplasma
A0A090N I60	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	-	Periplasma
A0A090N LU7	S-ribosylhomocysteinylase (Autoinducer-2 production protein LuxS)	quorum sensing	Citoplasma
A0A090N MK9	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	fatty acid biosynthetic process	Citoplasma
A0A090N JI3	Uncharacterized protein YbeL	-	Citoplasma
A0A090N N75	UPF0304 protein YfbU	-	Citoplasma
A0A090N HS1	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	dTDP-rhamnose biosynthetic process	-
A0A090N W17	10 kDa chaperonin (GroES protein) (Protein Cpn10)	protein folding	Citoplasma
A0A090N I38	50S ribosomal protein L10	ribosome biogenesis; translation	Citoplasma
A0A090N HZ6	50S ribosomal protein L11	translation	Citoplasma
A0A090N YG5	Translation initiation inhibitor	-	Citoplasma
A0A090N DR2	Thioredoxin	cell redox homeostasis; glycerol ether metabolic process	Citoplasma
A0A090N EM1	50S ribosomal protein L25	translation	Citoplasma
A0A090N L29	Ribosome-associated factor Y	primary metabolic process	Citoplasma
A0A090N I81	30S ribosomal protein S21	translation	Citoplasma
A0A090N NF1	30S ribosomal protein S15	translation	Citoplasma
A0A090N IK4	DNA-binding protein HU	chromosome condensation	Citoplasma

Tabela 11: Proteínas extracelulares diferenciais em meio VC identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

ID	Nomenclatura	Processo celular	Localização celular
A0A090N9W7	Aspartateammonia-lyase (Aspartase)	aspartatemetabolicprocess ; tricarboxylicacidcycle	Citoplasma
A0A0I3K409	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	glyoxylatecycle; tricarboxylicacidcycle	Citoplasma
A0A090NC74	Phosphopentomutase	5-phosphoribose 1-diphosphate biosyntheticprocess; cellularmetaboliccompound salvage; deoxyribonucleotidecatabolicprocess	Citoplasma
A0A090NEI4	Enolase	glycolyticprocess	Citoplasma
A0A090NXY0	Serinehydroxymethyltransferase (SHMT)	glycinebiosyntheticprocess fromserine; tetrahydrofolateinterconversion	Citoplasma
A0A090NEU6	Mannose-6-phosphateisomerase	carbohydratemetabolicprocess; GDP-mannosebiosyntheticprocess	-
A0A235MJB1	Glycerophosphoryldiesterphosphodiesterase	lipidmetabolicprocess	Periplasma
A0A090NEG6	Lactaldehydereductase	-	Citoplasma
A0A090NKL2	Malatedehydrogenase	carbohydratemetabolicprocess; malatemetabolicprocess; tricarboxylicacidcycle	-
A0A090NYV0	Adenylatekinase (AK) (EC 2.7.4.3) (ATP-AMP transphosphorylase)	adenylatekinaseactivity; ATP binding	Citoplasma
A0A090NAX9	Histidine-bindingprotein	transport	Membrana extracelular

A0A090N G09	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglyceratemutase (BPG-dependent PGAM)	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglyceratemutase activity	Citoplasma
A0A090N DL0	Cystine-bindingprotein	ionotropicglutamate receptor activity	Periplasma
A0A090N XW3	Peroxi redoxin	cell redox homeostasis; response to oxidative stress	Citoplasma
A0A090N EW6	Glutamine-bindingprotein		Periplasma
A0A090N KQ0	Fe/S biogenesis protein NfuA	iron-sulfur cluster assembly; protein maturation	Citoplasma
A0A090N HZ2	ProteinygiW		-
A0A090N Y77	Ferric uptake regulation protein	transcription, DNA-templated	Citoplasma

Tabela 12: Proteínas extracelulares comuns em meio LB e VC identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

ID	Nomenclatura	Processo celular	Localização celular
A0A090NJ59	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha (RNAP subunit alpha)	DNA binding; DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity; protein dimerization activity	Citoplasma
R4NJV1	Outer membrane protein in C (Fragment)	porin activity	Membrana extracelular
A0A090NFE7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NAD binding; NADP binding; oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	Citoplasma
A0A090NEY2	D-galactose-binding protein	-	Periplasma
A0A090NLB0	Elongation factor Ts (EF-Ts)	translation elongation factor activity	Citoplasma

A0A090NET7	Cysteinesynthase	cysteinesynthaseactivity; transferaseactivity	Citoplasma
A0A090NXW6	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase (HTPA synthase)	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	Citoplasma
A0A090NE91	Superoxidedismutase	metal ionbinding; superoxidedismutaseactivity	Periplasma
A0A090NGD8	Inorganicpyrophosphatase	inorganicdiphosphataseactivity; magnesiumionbinding	Citoplasma
A0A090NWB6	Thiolperoxidase (Tpx)	thioredoxinperoxidaseactivity	Periplasma
A0A090NF38	Outermembraneprotein X	-	Membrana extracelular
A0A090NEW9	Osmoticallyinducibleprotein Y	-	Periplasma
A0A090NLX4	Outermembraneprotein OmpH	unfoldedproteinbinding	Periplasma
A0A090NW30	Spheroplastprotein Y	-	Periplasma
A0A090NEA5	PTS system, glucosespecific IIA component	D-glucosamine PTS permeaseactivity; kinaseactivity; protein-N(PI)-phosphohistidine-sugar phosphotransferaseactivity	Citoplasma
A0A090NA33	DNA-bindingprotein	DNA binding; proteindimerizationactivity	Citoplasma
A0A090NMW7	50S ribosomalprotein L9	rRNAbinding; structuralconstituentofribosome	Citoplasma
A0A090NNG2	30S ribosomalprotein S6	rRNAbinding; structuralconstituentofribosome	Citoplasma
A0A090NXA1	Major outermembranelipoprotein	-	Membrana extracelular

Tabela 13: Proteínas intracelulares diferenciais em meio LB identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

ID	Nomeclatura da Proteína	Processo celular	Localização celular
A0A1E2VKT 8	Phosphoribosylformylglycinamidesynthase (FGAM synthase)	de novo' IMP biosyntheticprocess; glutaminemetabolic process	Citoplasma
A0A090NJK 2	30S ribosomalprotein S3	translation	Citoplasma
A0A127GT0 9	ProteinHfIK	celldivision	Citoplasma
A0A090NK5 5	Pyruvatedehydrogenase E1 component	-	Citoplasma
A0A090NFE 6	Putativemembraneassociatedprotein	-	Membrana citoplasmática
A0A090NFA 4	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	aerobicelectrontransportchain	Membrana citoplasmática
A0A090NFP 9	ProteinRecA (Recombinase A)	DNA recombination; DNA repair; SOS response	Citoplasma
A0A090NYC 3	Putativemembraneassociatedprotein	-	Citoplasma
I6HDR4	Oxoglutaratedehydrogenase (Succinyl-transferring)	tricarboxylicacidcycle	Citoplasma
A0A090NYD 7	NADP-dependentmalicenzyme	malatemetabolicprocess	Citoplasma
A0A090NI45	RNA polymerase sigma factorRpoD (Sigma-70)	transcriptioninitiationfrombacterial-type RNA polymerase promoter	Citoplasma
A0A090NGB 3	Isoleucine--tRNAligase	isoleucyl-tRNAaminoacylation	Citoplasma
A0A090NFJ5	Lon protease	cellular response to stress; proteinqualitycontrol for misfoldedorincompletelysynthesizedproteins	Citoplasma

I6H0M5	DNA gyrase subunit A	DNA-dependent DNA replication; DNA topological change	Citoplasma
A0A090NM98	DNA gyrase subunit B	DNA-dependent DNA replication; DNA topological change	Citoplasma
A0A090NKM4	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	glycolytic process	Citoplasma
A0A1E2VG70	DNA polymerase	DNA replication	Citoplasma
A0A235MRG5	Glycyl-radical enzyme activating protein	-	Citoplasma
A0A090NMC3	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	carbohydrate metabolic process	Citoplasma
A0A090NY81	Dihydropyridine dehydrogenase	cell redox homeostasis	Citoplasma
A0A090NB92	60 kDa chaperonin (GroEL protein) (Protein Cpn60)	protein refolding	Citoplasma
A0A090NNT5	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D	-	Citoplasma
A0A090NKA6	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) (PCK)	gluconeogenesis	Citoplasma
A0A090NEW4	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	Citoplasma
A0A090NBZ5	30S ribosomal protein S1	translation	-
A0A090NL45	GTP-binding protein TypA/BipA	-	Membrana citoplasmática
A0A090NFQ4	Probable cytosolic aminopeptidase	-	Citoplasma
A0A090NFC6	Fumarate hydratase class I	generation of precursor metabolites and energy	Citoplasma
A0A090NFX8	Threonine--tRNA ligase	threonyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
I6FIU0	Glycine--tRNA ligase beta subunit	arginyl-tRNA aminoacylation; glycyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma

		n	
A0A090NJY0	Glutamate--tRNA ligase	glutamyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NJ29	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	glutamine metabolic process; GMP biosynthetic processes	Citoplasma
A0A090NJC3	Peroxiredoxin reductase AhpF subunit	cell redox homeostasis; response to reactive oxygen species	Membrana citoplasmática
A0A090NF53	CTP synthase	de novo CTP biosynthetic processes; glutamine metabolic process	Citoplasma
A0A127GJJ4	Pyruvate kinase		Citoplasma
A0A090NWX7	Arginine--tRNA ligase	arginyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NPG1	Oligopeptidase A	-	Citoplasma
A0A090NFW8	Xaa-Pro dipeptidase (X-Pro dipeptidase)	-	Citoplasma
A0A090NPD9	Asparagine--tRNA ligase	asparaginyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NF86	ATP synthase subunit beta	ATP synthesis coupled proton transport	Citoplasma
A0A090NVS3	Glutamine--tRNA ligase	glutamyl-tRNA aminoacylation; glutamyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NFZ2	Peptidyl-dipeptidase dcp	-	Citoplasma
A0A090NIL4	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMP dehydrogenase) (IMPD)	GMP biosynthetic processes	Citoplasma
A0A090NBB7	Dihydroxy-acid dehydratase (DAD)	isoleucine biosynthetic process; valine biosynthetic process	Citoplasma

A0A090NY1 2	Proline--tRNA ligase	prolyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NNH 5	ABC transporter ATP-binding protein	negative regulation of translational elongation	Citoplasma
A0A090NF21	Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)	gluconeogenesis; glycolytic process	Citoplasma
A0A011PKR2	Lysine--tRNA ligase	lysyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NC4 3	Methionine--tRNA ligase	methionyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NWD 0	AMP nucleosidase	AMP salvage; nucleoside metabolic process	Citoplasma
A0A013K409	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	glyoxylate cycle; tricarboxylic acid cycle	Citoplasma
I6F4U5	Adenylosuccinate synthetase (AMPSase) (AdSS)	de novo' AMP biosynthetic processes	Citoplasma
A0A090NAI3	Bifunctional protein HldE	ADP-L-glycero-beta-D-mannoheptose biosynthetic processes	Citoplasma
A0A090NL47	GTPase Obg	ribosome biogenesis	Citoplasma
A0A090NEN 9	Fumarate hydratase class II (Fumarase C)	fumarate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	Citoplasma
A0A090NJ35	Histidine--tRNA ligase	histidyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NWN 2	Transcription termination factor Rho	DNA-templated transcription, termination; regulation of transcription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NEA 4	ATP-dependent RNA helicase RhlB	RNA catabolic process	Citoplasma
A0A090NDA 3	Argininosuccinate synthase	arginine biosynthetic process	Citoplasma

A0A090NMH3	Glucose-1-phosphateadenylyltransferase	glycogenbiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NLT7	D-alanine--D-alanineligase	cellwallorganization ; peptidoglycanbiosyntheticprocess; regulationofcellshape	Citoplasma
E2X3G7	Translationelongationfactor Tu		Citoplasma
A0A090NYB2	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase (AKB ligase)	biosyntheticprocesses; L-threoninecatabolicprocesses; glycolysis	Citoplasma
A0A127GMC7	Aminotransferase	biosyntheticprocesses; cellular amino acidmetabolicprocess	Citoplasma
A0A090NC74	Phosphopentomutase	5-phosphoribose 1-diphosphate biosyntheticprocesses; cellarmetaboliccompoundsalvage; deoxyribonucleotidecatabolicprocess	Citoplasma
A0A090NH03	Peptidase B (Aminopeptidase B)	-	Citoplasma
A0A090NMK0	D-aminoaciddehydrogenase	D-aminoacidcatabolic process	Membrana citoplasmática
A0A090NKQ8	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	cellcycle ; celldivision ; cellwallorganization ; peptidoglycanbiosyntheticprocess; regulationofcellshape ; UDP-N-acetylgalactosaminebiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NCT3	Iron-sulfur cluster carrierprotein	-	Membrana citoplasmática
A0A090NGM3	Fructose-1,6-bisphosphataseclass 1 (FBPaseclass 1)	carbohydratebiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NKJ	Rod shape-	cellmorphogenesis	Citoplasma

9 determiningproteinmreB			
I6HBQ2	Phosphoserineaminotransferase	L-serinebiosynthetic process; pyridoxinebiosynthetic process	Citoplasm
A0A090NG06	UDP-glucose 4-epimerase	galactose metabolic process	Citoplasm
A0A090NIA9	Low-specificity L-threoninealdolase	cellular amino acidmetabolic processes	Citoplasm
A0A090NW23	Glycine--tRNAligase alpha subunit	glycyl-tRNAaminoacylation	Citoplasm
A0A090NVR4	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	biosynthetic processes; UDP-glucose metabolic process	Citoplasm
A0A090NKW1	ATP-dependent 6-phosphofructokinase (ATP-PFK) (Phosphofructokinase)	fructose 6-phosphate metabolic process	Citoplasm
A0A090NKY2	L-threonine 3-dehydrogenase (TDH)	L-threoninecatabolic processes to glycine	Citoplasm
A0A090NJZ5	Phosphoribosylformylglycinamidinecyclo-ligase	de novo' IMP biosynthetic processes	Citoplasm
A0A090NW53	3-dehydroquinate synthase (DHQS)	aromatic amino acidfamilybiosynthetic process; chorismatebiosynthetic process	Citoplasm
A0A090NKL2	Malate dehydrogenase	carbohydrate metabolic process; malate metabolic process; tricarboxylic acid cycle	-
A0A090NGR9	23S rRNA methyltransferase	RNA processing	Citoplasm
A0A090NE86	HTH-type transcriptional repressor PurR	negative regulation of transcription, DNA-templated; purine nucleotide biosynthetic process; transcription, DNA-templated	Citoplasm

A0A090NF13	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	aromatic amino acidfamilybiosyntheticprocess; chorismatebiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NEA6	Ribosomal RNA smallsubunitmethyltransferase C	-	Citoplasma
A0A090NPH9	Outermembraneprotein F	iontransport	Membrana extracelular
I6H561	Outermembraneporinproteinom pD	porinactivity	Membrana extracelular
A0A090NN89	Tasprotein	-	Citoplasma
A0A090NE29	Glyoxylate/hydroxypyruvatereductase B	-	Citoplasma
A0A090NIT8	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotidesynthase (N5-CAIR synthase)	de novo' IMP biosyntheticprocess	Membrana citoplasmática
A0A090NGS4	NAD-dependentoxidoreductase	-	-
A0A090NB27	Anhydro-N-acetylmuramicacidkinase	1,6-anhydro-N-acetyl-beta-muramic acidcatabolicprocess; amino sugar metabolicprocess; carbohydratemetabolicprocess; peptidoglycanturnover	Membrana citoplasmática
A0A090NEF7	Lipoylsynthase	proteinlipoylation	Citoplasma
A0A090NXT9	Aspartate--ammonialigase	L-asparaginebiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NET7	Cysteinesynthase	cysteinebiosyntheticprocessfromserine	Citoplasma
A0A090ND83	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	fattyacidbiosyntheticprocess	Membrana citoplasmática
A0A127GTL3	Ribose-phosphatepyrophosphokinase (RPPK)	5-phosphoribose 1-diphosphate biosyntheticprocess; nucleosidemetabolism	Citoplasma

		cprocess; nucleotidebiosynth eticprocess; ribonucleosidemon ophosphatebiosynt heticprocess	
A0A090NCI1	Acetyl-coenzyme A carboxylasecarboxyltransferase subunit alpha (ACCasesubunit alpha)	fattyacidbiosyntheti cprocess; malonyl- CoAbiosyntheticpro cess	Citoplasma
A0A090NI42	Agmatinase	putrescinebiosynth eticprocessfromarg inine; spermidinebiosynth eticprocess	Citoplasma
A0A090NXZ 6	50S ribosomalprotein L2	translation	Citoplasma
A0A090NXW 6	4-hydroxy- tetrahydrodipicolinate synthase (HTPA synthase)	diaminopimelatebio syntheticprocess; lysinebiosyntheticp rocess via diaminopimelate	Citoplasma
A0A090NGX 1	Acetyl-coenzyme A carboxylasecarboxyltransferase subunit beta (ACCasesubunit beta)	fattyacidbiosyntheti cprocess; malonyl- CoAbiosyntheticpro cess	Citoplasma
A0A090NLL 7	Glucokinase	glycolyticprocess	Citoplasma
A0A090NZ55	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	fattyacidbiosyntheti cprocess	Citoplasma
A0A090NWE 3	Thioredoxinreductase	removalofsuperoxi deradicals	-
A0A090NEX 1	OxidoreductaseucpA	-	Citoplasma
A0A090NG7 2	Probabletranscriptionalregulator yproteinYebC	regulationoftranscri ption, DNA- templated; transcription, DNA- templated	Citoplasma
A0A090NLG 5	ProteinyicC	-	Citoplasma
A0A090NIB5	Peptidyl-prolylcis- transisomerase	proteinfolding	Periplasma

A0A090NXM5	ATP phosphoribosyltransferase (ATP-PRT)	histidine biosynthetic process	Citoplasma
A0A090NNB5	Cell division inhibitor	cell division	Citoplasma
A0A090NC51	Arabinose 5-phosphate isomerase (API)	carbohydrate derivative metabolic processes; carbohydrate metabolic process	-
A0A090NIC5	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	extracellular polysaccharide biosynthetic process	Citoplasma
A0A235P5M1	Uncharacterized protein	-	-
A0A090NJP2	30S ribosomal protein S4	translation	Citoplasma
A0A090NJJ8	50S ribosomal protein L4	translation	Citoplasma
A0A090NFK2	Uncharacterized protein	-	Membrana citoplasmática
A0A090NIN2	50S ribosomal protein L1	regulation of translation; translation	Citoplasma
A0A090NIV2	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	de novo IMP biosynthetic processes; cobalamin biosynthetic process	Citoplasma
A0A090NYJ9	30S ribosomal protein S2	translation	Citoplasma
A0A090NKE8	Stringent starvation protein A	-	Citoplasma
A0A090NG09	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase (BPG-dependent PGAM)	gluconeogenesis; glycolytic process	Citoplasma
A0A090NJ45	50S ribosomal protein L3	translation	Citoplasma
A0A090NY98	Transcriptional regulatory protein ompR	phosphorelay signal transduction system; regulation of transcription, DNA-templated; transcription, DNA-	Citoplasma

		templated	
A0A090NYV0	Adenylatekinase (AK)	AMP salvage	Citoplasma
A0A090NB63	Peptidyl-prolylcis-transisomerase	protein folding	Citoplasma
A0A090NCP8	Glutaredoxin 2	cell redox homeostasis	Citoplasma
A0A090ND27	ProteinGrpE (HSP-70 cofactor)	protein folding	Citoplasma
A0A090NXW3	Peroxiredoxin	cell redox homeostasis; response to oxidative stress	Citoplasma
A0A127GM02	Chloramphenicolacetyltransferase	response to antibiotic	-
A0A090NNL8	Aerobic respiration control protein arcA	phosphorelay signal transduction system; regulation of transcription, DNA-templated; transcription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NB53	Phosphoenolpyruvate synthase regulatory protein (PEP synthase regulatory protein) (PSRP)	protein dephosphorylation	Citoplasma
A0A090NC73	Deoxyribose-phosphate aldolase (DERA)	carbohydrate catabolic process; deoxyribonucleotide catabolic process; deoxyribose phosphate catabolic processes	Citoplasma
A0A090NJR1	Lipoprotein		Citoplasma
A0A090NCB7	Site-determining protein	cell division	Citoplasma
A0A090NBW8	Ribose-5-phosphate isomerase A	pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch	Citoplasma
A0A090NB24	Glutathione S-transferase		Citoplasma
A0A090NXP0	NIF3-related protein		Citoplasma

A0A090NF11	GTP cyclohydrolase 1	7,8-dihydroneopterin 3'-triphosphate biosynthetic process; one-carbon metabolic process; tetrahydrofolate biosynthetic process	Citoplasm
A0A090NZ63	Transcriptional regulatory protein phoP	phosphorelay signal transduction system; regulation of transcription, DNA-templated; transcription, DNA-templated	Citoplasm
A0A090NWU5	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE	aerobic respiration; menaquinone biosynthetic process; ubiquinone biosynthetic process	Citoplasm
A0A090NIE4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		Citoplasm
A0A090NKQ0	Fe/S biogenesis protein NfuA	iron-sulfur cluster assembly; protein maturation	Citoplasm
A0A090NL25	Transcriptional regulatory protein cpxR	phosphorelay signal transduction system; regulation of transcription, DNA-templated; transcription, DNA-templated	Citoplasm
A0A090NWD7	Phosphatase, HAD superfamily protein	metabolic process	Citoplasm
A0A090NKW5	Molybdenum cofactor sulfurase	-	-
A0A090NDY6	Glycoprotein/polysaccharide metabolism	-	-
A0A010TBL0	Glycoprotein/polysaccharide metabolism	-	Periplasm
A0A090NFB0	RNA chaperone ProQ	posttranscriptional regulation of gene expression	Citoplasm

A0A090NJ82	Pyruvate formate-lyase-activating enzyme	-	Citoplasma
A0A090NKH8	Negative regulator of allantoin and glyoxylate utilization operons	regulation of transcription, DNA-templated; transcription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NE81	Riboflavin synthase alpha chain		Citoplasma
A0A090NYD0	LPS ABC transporter ATP-binding protein	transmembrane transport	Citoplasma
A0A090NFZ1	ATP synthase gamma chain (ATP synthase F1 sector gamma subunit) (F-ATPase gamma subunit)	plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	Citoplasma
A0A090NMV5	UPF0502 protein YceH	-	-
A0A090NAU5	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	pantothenate biosynthetic process	Citoplasma
A0A090NCS9	Short chain dehydrogenase	-	Citoplasma
A0A1D3DJ17	Short chain dehydrogenase	-	Citoplasma
A0A0H9QSI4	Uracil phosphoribosyltransferase	UMP salvage; uracil salvage	Citoplasma
A0A090NMW7	NAD(P)H nitroreductase (Putative oxidoreductase)	-	-
A0A090NCR5	50S ribosomal protein L9	translation	Citoplasma
A0A090NL00	30S ribosomal protein S9	translation	Citoplasma
A0A090NX20	ATP synthase B chain	ATP synthesis coupled proton transport	Membrana citoplasmática
A0A090NA51	Osmotically inducible lipoprotein E	-	-

A0A090NMK9	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	fattyacidbiosynthesi cprocess	Citoplasma
A0A090NWY8	Lipoprotein	-	-
A0A090NDP8	50S ribosomalprotein L19	translation	Citoplasma
A0A090NLN6	Peptidoglycanbindingprotein (LysMdomain)	-	-
A0A090NJ50	50S ribosomalprotein L14	rRNAbinding; structuralconstituen tofribosome	Citoplasma
A0A090NN98	Ribosome-bindingfactor A	maturationof SSU- rRNA	Citoplasma
A0A090NLJ5	SmallheatshockproteinIbpA (16 kDaheatshockprotein A)	proteinstabilization	Citoplasma
A0A090NY00	30S ribosomalprotein S11	translation	Citoplasma
A0A090N9E4	Uncharacterizedprotein	-	-
A0A090NDP8	50S ribosomalprotein L19	translation	Citoplasma
A0A090NJ47	50S ribosomalprotein L22	translation	Citoplasma
A0A090NXZ8	30S ribosomalprotein S14	translation	Citoplasma
A0A090NM95	ProteintranslocasesubunitYajC	-	Membrana citoplasmática
A0A090NIU6	Universal stress proteinfamilyprotein	response to stress	Citoplasma
A0A090NH51	Inhibitorofvertebratelysozyme	negative regulationofcatalyti cactivity	Periplasma
A0A090NXI9	ElaBprotein	cellular response to stress	-
A0A090N9T6	Surface presentationofantigenproteins paK	-	-
A0A090NCR7	Uncharacterizedprotein	-	-

A0A090NI81	30S ribosomalprotein S21	translation	Citoplasma
A0A090NNB7	30S ribosomalprotein S18	translation	Citoplasma
A0A090NHK0	UPF0145 proteinYbjQ	-	-
A0A090NLH4	50S ribosomalprotein L28	translation	Citoplasma
A0A090NGJ4	Intracellularsulfurreductionprote in	-	-
A0A090NEM1	50S ribosomalprotein L25	translation	Citoplasma
A0A090NLE9	DNA-directed RNA polymerasesubunitomega (RNAP omegasubunit)	transcription, DNA- templated	Citoplasma
A0A090NFK1	BolAprotein	-	-
A0A090NJL0	50S ribosomalprotein L18	translation	Citoplasma

Tabela 14: Proteínas intracelulares diferenciais em meio VC identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

ID	Nomenclatura	Processo celular	Localização celular
A0A090NXA1	Major outermembranelipoprotein	-	Membrana extracelular
A0A090NZ02	Phosphateacetyltransferase	acetyl-CoAbiosyntheticprocess	Citoplasma
I6H289	Beta-galactosidase (Beta- gal)	carbohydratemetabolicprocess	-
A0A090NLF3	Outermembraneproteinasse mblyfactorBamA	Gram-negative-bacterium- typecelloutermembraneassembl y; proteininsertionintomembrane	Membrana extracelular
A0A090NC46	Phosphate- bindingproteinPstS	phosphateiontransmembranetra nsport	Periplasma
A0A090NZ12	Translationinitiationfactor IF-2	-	Citoplasma

A0A090 NLW2	PeriplasmicserineendoproteaseDegP-like	-	Periplasma
A0A0H2 V1S1	Outermembranefluffingprotein	-	Membrana extracellular
A0A090 NYL0	Succinate--CoAligase [ADP-forming] subunit beta	tricarboxylicacidcycle	Citoplasma
A0A090 NXB5	ChaperoneSurA (Peptidyl-prolylcis-transisomeraseSurA)	chaperonemediatedproteinfoldin grequiringcofactor; Gram-negative-bacterium-typecelloutermembraneassembly; maintenanceofstationaryphase ;proteinstabilization	Periplasma
I6H0N1	Glycerophosphoryldiesterphosphodiesterase	lipidmetabolicprocess	Periplasma
A0A127 GV72	Invasin	pathogenesis	Extracellular
A0A090 NFB2	Aldose 1-epimerase	galactose metabolicprocess	Periplasma
A0A090 NG16	Galactokinase	galactose metabolicprocess	Citoplasma
A0A1S9 KCV2	Flavohemoprotein	response tonitrosative stress; response totoxicsubstance	Citoplasma
A0A090 NK84	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (GSA)	protoporphyrinogen IX biosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090 NFD6	ProteinTolB	proteinimport	Periplasma
A0A090 NH18	Aspartate-semialdehydedehydrogenase	cellular amino acidbiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090 NDY8	S-adenosylmethioninesynthase (AdoMetsynthase)	one-carbonmetabolicprocess; S-adenosylmethioninebiosynthetic process	Citoplasma
A0A090 NNX7	Putrescine-bindingperiplasmicprotein	polyaminetransport	Periplasma
A0A0H9 GHL4	Invasin (InvasinproteinIpaD)	pathogenesis	Extracellular
A0A090 NNW5	ChaperoneproteinDnaJ	DNA replication; proteinfolding; response toheat	Citoplasma
I6H561	OutermembraneporinproteinompD	porinactivity	Membrana extracel

			ular
I6HHU1	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	NAD biosynthetic process	Citoplasma
A0A090NW52	Tryptophan--tRNA ligase	tryptophanyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NGY4	50S ribosomal protein L3 glutaminemethyltransferase (L3 MTase)	peptidyl-glutaminemethylation	Citoplasma
A0A090NE91	Superoxide dismutase		Periplasma
A0A127GKI2	Translation initiation factor IF-3		Citoplasma
A0A090NGD8	Inorganic pyrophosphatase	phosphate-containing compound metabolic process	Citoplasma
A0A090NJP9	Peptide deformylase (PDF)	translation	Citoplasma
A0A127GKP1	Thioredoxin/glutathione peroxidase BtuE	response to oxidative stress	Periplasma
A0A090NND3	NADH-quinone oxidoreductase chain E	-	Citoplasma
A0A090NFG3	Uncharacterized protein	-	Citoplasma
A0A090NCA6	Elongation factor P (EF-P)	-	Citoplasma
A0A090NW86	ATP-dependent protease subunit HslV	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	Citoplasma
A0A090NGA8	Co-chaperone protein HscB (Hsc20)	protein folding; protein maturation by iron-sulfur cluster transfer; protein oligomerization	Citoplasma
A0A090NGX6	Uncharacterized protein (Fragment)	-	-
A0A127GRK6	ATP synthase subunit delta	ATP synthesis coupled proton transport	Citoplasma
A0A090NI60	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	-	Periplasma
A0A090NLX4	Outer membrane protein OmpH	-	Periplasma
A0A090NEW9	Osmotically inducible protein Y	-	Periplasma

A0A090 NYB8	Biotincarboxylcarrierprotein ofacetyl-CoAcarboxylase	fattyacidbiosyntheticprocess	Citoplas ma
A0A090 NGY0	Peptidyl-prolylcis- transisomerase	-	Citoplas ma
A0A090 NCH2	Shikimatekinase 1 (SK 1)	aromatic amino acidfamilybiosyntheticprocess; chorismatebiosyntheticprocess	Citoplas ma
A0A090 NJ17	Peptidyl-prolylcis- transisomerase (PPIase)	proteinfolding	Citoplas ma
A0A090 NEM8	Xanthinephosphoribosyltran sferase	purineribonucleosidesalvage; XMP salvage	Citoplas ma
A0A090 NHS1	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	dTDP- rhamnosebiosyntheticprocess	-
A0A090 NX61	ProteinytfJ	-	-
A0A090 NL57	Lipopolysaccharideexport system proteinLptA	Gram-negative-bacterium- typecelloutermembraneassembl y; lipopolysaccharidetransport	Periplas ma
A0A090 NN74	RNA-bindingproteinHfq	regulationoftranscription, DNA- templated	Citoplas ma
A0A090 NMP9	Uncharacterizedprotein	-	-
A0A090 NHZ2	ProteinygiW	-	-
A0A090 NM58	DNA-bindingprotein	regulationoftranscription, DNA- templated	Citoplas ma
A0A090 NXN3	30S ribosomalprotein S7	translation	Citoplas ma
A0A090 NEA5	PTS system, glucose- specific IIA component	phosphoenolpyruvate- dependent sugar phosphotransferase system	Citoplas ma
A0A127 GPV5	PTS system N- acetylgalactosamine- specifictransportersubunit IIA	phosphoenolpyruvate- dependent sugar phosphotransferase system	Citoplas ma
A0A090 NNE5	Acetyltransferase	-	Citoplas ma
A0A090 NG18	Molybdenumcofactorbiosynt hesisprotein B	Mo- molybdopterincofactorbiosynthe ticprocess	Citoplas ma
A0A090 NLY5	Transcriptionantitermination proteinNusB (AntiterminationfactorNusB)	DNA-templatedtranscription, termination; transcriptionantitermination	Citoplas ma
A0A090 NMS4	Outermembraneprotein	-	Membra na

			extracelular
A0A090 NJI3	Uncharacterizedprotein	-	Citoplasma
A0A090 NEZ2	Ribosome-associatedfactor Y	primarymetabolicprocess	Citoplasma
A0A1S9I VY5	Integrase	DNA integration; DNA recombination	Citoplasma
A0A090 NWR1	Coldshockprotein	regulationoftranscription, DNA- templated	Citoplasma
A0A090 NG88	Uncharacterizedprotein	-	-
A0A090 NJE5	Nitrogenregulatoryprotein P-II	regulationofnitrogenutilization; regulationoftranscription, DNA- templated;	Membrana citoplasmática

Tabela 15: Proteínas intracelulares comuns em meio LB e VC identificadas na cepa clínica de *Shigella flexneri* str.201.

ID	Nomenclatura	Processo celular	Localização celular
A0A090NXR1	DNA-directed RNA polymerasesubunit beta (RNAP subunit beta)	DNA binding; DNA-directed 5'-3' RNA polymeraseactivity; ribonucleosidebinding	Citoplasma
A0A090NFK8	ElaBprotein	ribosomebinding	-
A0A090NM21	Citratesynthase	citrate (Si)-synthaseactivity	Citoplasma
A0A090NJNI8	50S ribosomalprotein L15	rRNAbinding; structuralconstituentofribosome	Citoplasma
A0A090NYL1	Succinatedehydrogenaseflavoproteinsubunit	flavinadeninedinucleotidebinding; succinatedehydrogenase (ubiquinone) activity	Membrana intracelular
A0A090NG81	Formate-dependentphosphoribosylglycinamideformyltransferase	ATP binding; magnesiumionbinding; phosphoribosylglycinamideformyltransferase 2 activity; phosphoribosylglycina	Membrana citoplasmática

		midformyltransferase activity	
A0A090NNW4	Glutathionereductase	electrontransferactivity; flavinadeninedinucleoti debinding; glutathione-disulfidereductaseactivit y; NADP binding	Citoplasma
A0A090NFF7	ATP synthasesubunit alpha	ATP binding; proton-transporting ATP synthaseactivity, rotationalmechanism	Citoplasma
A0A090NNF4	ChaperoneproteinDna K (HSP70)	ATP binding; unfoldedproteinbinding	Citoplasma
A0A0I4UQE6	Ketol-acidreductoisomerase	isomeraseactivity; ketol-acidreductoisomerasea ctivity; magnesiumionbinding; nucleotidebinding	Citoplasma
A0A090N9W7	Aspartateammonia-lyase (Aspartase)	aspartateammonia-lyaseactivity	Citoplasma
I6H9C9	Trigger factor (TF)	peptidyl-prolylcis-transisomeraseactivity	Citoplasma
A0A127GHK8	Dihydrolipoyllysine-residuesuccinyltransfe rasecomponentof 2-oxoglutarate dehydrogenasecomple x	dihydrolipoyllysine-residuesuccinyltransfer aseactivity	Citoplasma
A0A090NAI6	ChaperoneproteinClpB	ATP binding	Citoplasma
A0A090NHN9	Elongationfactor G (EF-G)	GTPaseactivity; GTP binding; translationelongationfac toractivity	Citoplasma
A0A090NXY0	Serinehydroxymethyltr ansferase (SHMT)	glycinehydroxymethyltr ansferaseactivity; methyltransferaseactivit y; pyridoxalphosphatebind ing	Citoplasma
A0A090NH22	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	metabolicprocess	Citoplasma
I6GVN3	Enolase	glycolyticprocess	Citoplasma
A0A090NXX7	Serine--tRNAligase	ATP binding; serine-tRNAligaseactivity	Citoplasma

A0A090NEQ7	Phosphoglycerate kinase	glycolytic process	Citoplasma
A0A090NJ59	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha (RNAP subunit alpha)	DNA binding; DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity; protein dimerization activity	Citoplasma
A0A090NKL5	Cell division protein FtsZ	GTPase activity; GTP binding	Citoplasma
A0A090NWR7	Fructose-bisphosphate aldolase	fructose-bisphosphate aldolase activity; zinc ion binding	Citoplasma
R4NJV1	Outer membrane protein C (Fragment)	porin activity	Membrana extracelular
A0A090NFE7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NAD binding; NADP binding; oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	Citoplasma
A0A090NZ31	Transaldolase	sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycerone transferase activity	Citoplasma
A0A090NK95	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	ADP-glyceromanno-heptose 6-epimerase activity; NADP binding	Citoplasma
A0A012EAA6	tRNA-modifying protein YgfZ	folic acid binding	Citoplasma
A0A090NL96	Selenide, water dikinase	ATP binding; magnesium ion binding; selenide, water dikinase activity	Citoplasma
A0A090NLB0	Elongation factor Ts (EF-Ts)	translation elongation factor activity	Citoplasma
A0A090NDL5	Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.-)	metal ion binding; oxidoreductase activity	Citoplasma
A0A1E2VIK7	Phosphoporphin PhoE	porin activity	Membrana extracelular
A0A090NG94	Uncharacterized protein	transferase activity	Periplasma

A0A090NAA7	Phosphofructokinase	ATP binding; kinaseactivity; phosphotransferaseacti vity, alcoholgroup as acceptor	Citoplasma
A0A090NLF6	Ribosome- recyclingfactor (RRF) (Ribosome- releasingfactor)	translational termination	Citoplasma
A0A090NIY8	30S ribosomalprotein S5	rRNAbinding; structuralconstituentofri bosome	Citoplasma
A0A090NWB6	Thiolperoxidase (Tpx)	thioredoxinperoxidasea ctivity	Periplasma
A0A090NIX9	50S ribosomalprotein L16	rRNAbinding; structuralconstituentofri bosome; tRNAbinding	Citoplasma
A0A090NIY3	50S ribosomalprotein L5	rRNAbinding; structuralconstituentofri bosome; tRNAbinding	Citoplasma
A0A090NF38	Outermembraneprotei n X	-	Membrana extracelular
A0A090NI38	50S ribosomalprotein L10	largeribosomalsubunitr RNAbinding; structuralconstituentofri bosome	Citoplasma
A0A090NBG8	Single-stranded DNA- bindingprotein (SSB)	single-stranded DNA binding	Citoplasma
A0A090NY77	Ferricuptakeregulation protein	DNA binding; DNA bindingtranscriptionfact oractivity; metal ionbinding	Citoplasma
A0A090NLU7	S- ribosylhomocysteinely ase	ironionbinding; S- ribosylhomocysteinelya seactivity	Citoplasma
A0A090NC22	Regulatorofribonuclea seactivity A	endoribonucleaseinhibit oractivity; enzymebinding; methyltransferaseactivit y	Citoplasma
A0A090NKL6	50S ribosomalprotein L13	structuralconstituentofri bosome	Citoplasma
A0A090NW82	UPF0234 proteinYajQ	-	Citoplasma
A0A090NYW6	Transcriptionterminatio n/antiterminationprotei nNusG	-	Citoplasma

A0A090NCQ3	Ferritin	ferricironbinding	Citoplasma
A0A090NJ52	50S ribosomalprotein L6	rRNAbinding; structuralconstituentofribose	Citoplasma
A0A090NLE7	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase)	dUTPdiphosphataseactivity; magnesiumionbinding	-
A0A090NJL7	50S ribosomalprotein L17	structuralconstituentofribose	Citoplasma
I6HG28	Uncharacterizedprotein		Citoplasma
A0A090NNG2	30S ribosomalprotein S6	rRNAbinding; structuralconstituentofribose	Citoplasma
A0A090NL75	TranscriptionelongationfactorGreA (TranscriptcleavagefactorGreA)	DNA binding; RNA polymerasebinding; translationelongationfactoractivity	Citoplasma
A0A090NET6	Peptidoglycan-associatedlipoprotein	-	Membrana extracelular
A0A142H7J1	Bacterioferritin	ferricironbinding; ferroxidaseactivity	Citoplasma
A0A090NP61	Acylcarrierprotein (ACP)	acylcarrieractivity	Citoplasma
A0A090NJL6	RNA polymerase-bindingtranscriptionfactorDksA	zincionbinding	Citoplasma
A0A090NIV5	Thioredoxinperoxidase	peroxidaseactivity; peroxiredoxinactivity	Citoplasma
A0A0H9UKU6	Flavodoxin	electrontransferactivity; FMN binding	Citoplasma
A0A090NIK0	Nucleosidediphosphat kinase (NDK)	ATP binding; metal ionbinding; nucleosidediphosphate kinaseactivity	Citoplasma
A0A090NA33	DNA-bindingprotein	DNA binding; proteindimerizationactivity	Citoplasma
I6G6J7	50S ribosomalprotein L11	translation	Citoplasma
A0A090NW17	10 kDachaperonin (GroESprotein) (Protein Cpn10)	ATP binding	Citoplasma

A0A090NHN6	30S ribosomal protein S8	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NGW9	Uncharacterized protein	-	-
A0A090NLA3	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	3-hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	Cytoplasm
A0A090NYK0	UPF0325 protein YaeH	-	Cytoplasm
A0A090NIZ2	30S ribosomal protein S13	rRNA binding; structural constituent of ribosome; tRNA binding	Cytoplasm
A0A127GQ91	50S ribosomal protein L24	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NDR2	Thioredoxin	protein disulfide oxidoreductase activity	Cytoplasm
A0A090NYG5	Translation initiation inhibitor		Cytoplasm
A0A090NIM2	50S ribosomal protein L7/L12	structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NJM6	30S ribosomal protein S10	structural constituent of ribosome; tRNA binding	Cytoplasm
A0A090NNM3	D-erythro-7,8-dihydroneopterin triphosphate epimerase	dihydroneopterin aldolase activity; isomerase activity	Cytoplasm
A0A090NG20	Integration host factor subunit alpha (IHF-alpha)	DNA binding	Cytoplasm
A0A090NFL4	UPF0265 protein YeeX	-	Cytoplasm
A0A090NIK4	DNA-binding protein HU	DNA binding	Cytoplasm
A0A090NDK3	30S ribosomal protein S16	structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NEE0	Glutaredoxin	2 iron, 2 sulfur cluster binding; electron transfer activity; metal ion binding; protein disulfide oxidoreductase activity	-

uctaseactivity			
A0A090NEF4	Coldshockprotein	DNA binding	Citoplasma
A0A090NNF1	30S ribosomalprotein S15	rRNAbinding; structuralconstituentofribose	Citoplasma
A0A090NF12	DNA-bindingprotein HU	DNA binding	Citoplasma
A0A090NP68	Adenosine 5'-monophosphoramidase	catalyticactivity	Citoplasma
A0A090NJM9	30S ribosomalprotein S19	rRNAbinding; structuralconstituentofribose	Citoplasma
A0A090NGX7	30S ribosomalprotein S20	rRNAbinding; structuralconstituentofribose	Citoplasma
A0A090NDG2	Translationinitiationinhibitor	-	Citoplasma
A0A090NL29	Ribosome-associatedfactor Y	-	Citoplasma
A0A090NKA0	Glutaredoxin	electrontransferactivity; proteindisulfideoxidoreductaseactivity	-

Tabela 16: Proteínas intracelulares diferenciais em meio LB identificadas na cepa de referência *Shigella flexneri* 5a M90T.

ID	Nomeclatura	Processo celular	Localização celular
A0A090NLW4	Aconitatehydratase 2	tricarboxylicacid cycle	Citoplasma
A0A1S9JCF0	Glycinedehydrogenase (decarboxylating)	glycinedecarboxylation via glycinecleavage system	Citoplasma
A0A1S9JIN2	Lon protease	cellular response to stress; proteinqualityco	Citoplasma

		ontrol for misfoldedorinco mpletelysynthes izedproteins	
I6GY45	Alanine--tRNA ligase	alanyl- tRNA aminoacyl ation	Citoplasma
F5P120	Peroxidase	hydrogen peroxide catabolic proces s; response to oxidative stress	Citoplasma
A0A0H9VH5 9	Catalase	hydrogen peroxide catabolic proces s; response to oxidative stress	Citoplasma
A0A090NYZ 5	Ribonuclease R (RNase R)	-	Citoplasma
D6BFZ0	tRNA modification GTPase MnmE	tRNA modification	Citoplasma
A0A090NYD 7	NADP-dependent malic enzyme	malate metabolism	Citoplasma
I6H9H4	Chaperone protein HtpG (Heat shock protein HtpG)	protein folding; response to stress	Citoplasma
A0A090NL4 5	GTP-binding protein TypA/BipA	-	Membrana citoplasmática
A0A090NY1 2	Proline--tRNA ligase	prolyl- tRNA aminoacyl ation	Citoplasma
A0A090NC4 3	Methionine--tRNA ligase	methionyl- tRNA aminoacyl ation	Citoplasma
A0A0I1R747	ATP-dependent RNA helicase DeaD	cellular response to cold; ribosome large subunit assembly ; RNA catabolic proces s	Citoplasma
A0A090NVS 3	Glutamine--tRNA ligase	glutamyl- tRNA aminoacyl ation; glutamyl-	Citoplasma

		tRNAaminoacylation	
E2X8F2	Glutamatedecarboxylase	glutamatemetabolicprocess	Citoplasma
A0A090NC21	ATP-dependent protease ATPasesubunitHslU (HeatshockproteinHslU)	proteinunfolding	Citoplasma
A0A090NF21	Glucose-6-phosphateisomerase (GPI)	gluconeogenesis; glycolyticprocess	Citoplasma
A0A011PKR2	Lysine--tRNAligase	lysyl-tRNAaminoacylation	Citoplasma
A0A090NNZ5	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyladenosinesynthase	tRNAmodification	Citoplasma
A0A090NJ35	Histidine--tRNAligase	histidyl-tRNAaminoacylation	Citoplasma
A0A142H699	Peptidechain release factor 2 (RF-2)	-	Citoplasma
A0A090NKA6	Phosphoenolpyruvatecarboxykinase (ATP)	gluconeogenesis	Citoplasma
A0A127GV17	Virulencefactor	-	Extracelular
A0A090NE48	Aminoacyl-histidinedipeptidase	-	Citoplasma
A0A011VDC7	InositolphosphatephosphataseIpgD	pathogenesis	Extracelular
A0A090NWJ3	Glycerol-3-phosphatedehydrogenase	glycerol-3-phosphatemetabolicprocess	Citoplasma
A0A0H2USP8	Uncharacterizedprotein	-	Citoplasma
A0A090NEP7	Respiratorynitratereductase beta chain	nitratemetabolicprocess	Membrana citoplasmática
I6GZT8	PTS system, fructosesubfamily, IIA componentdomainprotein	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system; phosphorylation	Citoplasma

A0A090NH2 2	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	metabolic processes	Citoplasma
Q6UJ83	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	D-gluconate metabolic process; pentose-phosphate shunt	Citoplasma
A0A090NL4 7	GTPase Obg	ribosome biogenesis	Citoplasma
A0A090NEA 4	ATP-dependent RNA helicase RhIB	RNA catabolic processes	Citoplasma
A0A090NFM 6	Zinc protease	-	-
P18012	Invasin IpaC (42 kDa antigen)	pathogenesis	Extracellular
A0A090NKL 5	Cell division protein FtsZ	cell septum assembly; FtsZ-dependent cytokinesis; protein polymerization	Citoplasma
A0A090NDY 8	S-adenosylmethionine synthase (AdoMet synthase)	one-carbon metabolic process; S-adenosylmethionine biosynthetic process	Citoplasma
A0A090NP9 7	PhoH-like protein	-	Citoplasma
I6H0N1	Glycerophosphoryldiester phosphodiesterase	lipid metabolic process	Periplasma
I6F4U5	Adenylosuccinate synthetase (AMPSase)	de novo' AMP biosynthetic process	Citoplasma
A0A090NW7 3	Aminomethyltransferase	glycine decarboxylation via glycine cleavage system	Citoplasma
A0A090NFD 6	Protein TolB	protein import	Periplasma
A0A090NA7 3	Glucose-1-phosphatase	-	Periplasma
A0A090NCT 3	Iron-sulfur cluster carrier protein	-	Membrana citoplasmática

a			
A0A090NNB9	Virulence proteinVirB	-	Citoplasma
A0A090NJF2	D-lactatedehydrogenase	-	Citoplasma
A0A090NB76	Quinoneoxidoreductase	-	Citoplasma
A0A090NNX7	Putrescine-bindingperiplasmicprotein	polyaminetransport	Periplasma
A0A090NVR4	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	biosyntheticprocess; UDP-glucose metabolicprocess	Citoplasma
I6HFI3	3-dehydroquinate synthase (DHQS)	aromatic amino acidfamilybiosyntheticprocess; chorismatebiosyntheticprocess	Citoplasma
I6HHU1	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	NAD biosyntheticprocess	Citoplasma
I6HBQ2	Phosphoserineaminotransferase	L-serinebiosyntheticprocess; pyridoxinebiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NGN0	Uncharacterizedprotein	-	-
A0A090NK90	D-threo-aldose 1-dehydrogenase	-	Citoplasma
A0A090NXT9	Aspartate--ammonialigase	L-asparaginebiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NN89	Tasprotein	-	Citoplasma
A0A090NLQ3	Anthranilatephosphoribosyltransferase	-	Citoplasma
A0A090NIA9	Low-specificity L-threoninealdolase	cellular amino acidmetabolicprocess	Citoplasma
A0A090NGR9	23S rRNAmethyltransferase	RNA processing	Citoplasma

A0A090NMB9	Aspartate-semialdehydedehydrogenase (ASA dehydrogenase)	de novo' L-methioninebiosyntheticprocess ; diaminopimelatebiosyntheticprocess; isoleucinebiosyntheticprocess; lysinebiosyntheticprocess via diaminopimelate; threoninebiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A0I5Z9H3	Putativeoutermembraneporeprotein	iontransport	Membrana extracelular
A0A090NZ55	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	fattyacidbiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NXP5	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	lipopolysaccharidebiosyntheticprocess	Citoplasma
F5NX75	Galactose-bindingtransportprotein	-	Periplasma
A0A090NH78	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase (DHNA-CoA synthase)	menaquinonebiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NLL7	Glucokinase	glycolyticprocess	Citoplasma
A0A090NGX6	ProteinYdgH	-	-
A0A090NEJ0	ProbableL,D-transpeptidaseYbiS	-	-
A0A090NEX1	OxidoreductaseucpA	-	Citoplasma
A0A090NWG1	N-acetylmuramicacid 6-phosphate etherase (MurNAc-6-P etherase)	1,6-anhydro-N-acetyl-beta-muramic acidcatabolicprocess; carbohydratemetabolicprocess ; N-acetylmuramic acidcatabolicprocess; peptidoglycantu	Citoplasma

rnover			
A0A090NKP 2	D-alanine--D-alanine ligase	cell wall organization; peptidoglycan biosynthetic process; regulation of cell shape	Citoplasm
A0A090NNS 5	Acetate kinase	acetyl-CoA biosynthetic process; organic acid metabolic process	Citoplasm
I6HGY5	Putative glucose-6-phosphate 1-epimerase	carbohydrate metabolic process	Citoplasm
A0A090NWH 8	Putative carboxymethylenebutanolidase	hydrolase	-
A0A090NLJ 2	Sigma-E factor regulatory protein rseB	-	Periplasm
A0A090NFG 2	Periplasmic metal binding protein	cell adhesion ; metal ion transport	Periplasm
A0A090NEW 6	Glutamine-binding protein	-	Periplasm
A0A090NYV 0	Adenylate kinase (AK)	AMP salvage	Citoplasm
A0A090NXW 3	Peroxi redoxin	cell redox homeostasis; response to oxidative stress	Citoplasm
A0A090NJR 1	Lipoprotein	-	Citoplasm
A0A090NX5 0	4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	metabolic process	Citoplasm
A0A0I0AXL2	Putative ribosome maturation factor (Threonylcarbamoyl-AMP synthase)	-	Citoplasm
A0A090NW U5	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE	aerobic respiration; menaquinone biosynthetic process; ubiquinone biosynthetic process	Citoplasm
A0A090N99 4	MxiG protein	-	Citoplasm

A0A090NDY6	Glycoprotein/polysaccharidemetabolism	-	-
A0A0I0TBL0	Glycoprotein/polysaccharidemetabolism	-	Periplasma
A0A0I1VAV0	Putativetransporter	-	-
A0A090NKW5	Succinate-semialdehydedehydrogenase I	gamma-aminobutyricacidcatabolicprocess	Citoplasma
A0A090NGZ7	tRNA (cytidine/uridine-2'-O)-methyltransferaseTrmJ	tRNAprocessing	Citoplasma
A0A090NYD0	LPS ABC transporter ATP-bindingprotein	transmembranetransport	Citoplasma
A0A0A7A4R8	Acidphosphatase	-	Periplasma
A0A090NWY7	ATP-dependentClp protease proteolyticsubunit	-	Citoplasma
A0A090NFU2	GAF domain-containingprotein	-	-
A0A090NJM7	Putativegammacarboxyanhydrase-likeprotein	-	Citoplasma
A0A090NIK6	proteinYfgM	-	Periplasma
A0A090ND26	ATP-dependent DNA helicaserecQ	DNA recombination; DNA repair;DNA replication; SOS response	Citoplasma
I6HG28	Uncharacterizedprotein		-
A0A090NY67	Ureidoglycolatelyase	allantoincatabolicprocess; purinenucleobasecatabolicprocess	-
A0A090NLT0	Transcriptional repressor NrdR	negative regulationoftranscription, DNA-templated; transcription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NMK9	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	fattyacidbiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NEA0	Lactoylglutathionelyase	-	Citoplasma

A0A090NL5 2	Putativecytosolicprotein	-	Citoplasma
A0A090NZ2 1	Type III secretionchaperone	response to stress	Citoplasma
A0A090NPG 6	Universal stress protein	response to stress	Citoplasma
A0A090NHZ 2	ProteinygiW	-	-
A0A090NLJ 5	SmallheatshockproteinIbpA (16 kDaheatshockprotein A)	proteinstabilizati on	Citoplasma
A0A090NLN 6	Peptidoglycanbindingprotein (LysMdomain)		-
A0A090NIB1	30S ribosomalprotein S12	translation	Citoplasma
A0A090NVP 5	Acid stress chaperoneHdeB	cellular response to stress; response to pH	Periplasma
A0A090NKB 2	CoAbindingprotein	-	-
A0A0H7PB2 9	Uncharacterizedconservedprotein	-	-
A0A0K9CN8 6	Uncharacterizedprotein (Fragment)	-	Citoplasma
A0A0I0FY92	Spa33	proteinsecretion	Citoplasma
A0A090NXM 1	PanDregulatoryfactor	pantothenatebio syntheticproces s; zymogenactivati on	-
A0A090NBU 6	Coldshockprotein	regulationoftran scription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NFK 1	BolAprotein	-	-
A0A090NF1 3	UPF0250 proteinYbeD	-	Citoplasma
A0A090NKA 0	Glutaredoxin	cell redox homeostasis	-

A0A090NEF 4	Coldshockprotein	regulationoftran scription, DNA- templated	Citoplasma
A0A090NJNI 3	30S ribosomalprotein S17	translation	Citoplasma
A0A090NYI0	Translationinitiationinhibitor	-	Citoplasma
A0A090NL2 9	Ribosome-associatedfactor Y	primarymetaboli cprocess	Citoplasma
A0A090ND0 6	Entericidin B	response totoxicsubstanc e	Membrana citoplasmátic a
A0A090NCR 7	Uncharacterizedprotein	-	-
A0A090NYD 3	50S ribosomalprotein L21	translation	Citoplasma
A0A090NBH 1	Integration host factorsubunit beta (IHF-beta)	DNA recombination; regulationoftran scription, DNA- templated; regulationoftran slation; transcription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NXZ 9	50S ribosomalprotein L30	translation	Citoplasma
A0A090NEG 0	D-alanyl-D-alanineserine- typecarboxypeptidase	serine-type D- Ala-D-Ala carboxypeptida seactivity	Membrana citoplasmátic a
A0A090NB2 6	Pyrimidine/purinenucleosidephosp horylase	-	-

Tabela 17: Proteínas intracelulares diferenciais em meio VC identificadas na cepa de referência *Shigella flexneri* 5a M90T.

ID	Nomenclatura	Processo celular	Localização celular
A0A090NW Q2	Respiratorynitrater eductase alpha chain	nitratemetabolicprocess	Membrana citoplasmática
A0A090NZ0 2	Phosphateacetyltr ansferase	acetyl- CoAbiosyntheticprocess	Citoplasma

A0A090NKK8	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	cell division; protein catabolic process	Membrana citoplasmática
A0A090NYL1	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	electron transport chain; tricarboxylic acid cycle	Membrana citoplasmática
A0A090NC10	Aconitate hydratase (Aconitase)	metabolic process	Citoplasma
A0A090NLF3	Outer membrane protein assembly factor BamA	Gram-negative-bacterium-type cell outer membrane assembly; protein insertion into membrane	Membrana extracelular
F5MX75	Protein translocase subunit SecA	intracellular protein transmembrane transport; protein import; protein targeting	Membrana extracelular
A0A090NM98	DNA gyrase subunit B	DNA-dependent DNA replication; DNA topological change	Citoplasma
A0A090NHJ3	Signal recognition particle receptor FtsY (SRP receptor)	cell division; SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	Citoplasma
A0A0I1UKC1	Aspartyl-tRNA synthetase	tRNA aminoacylation for protein translation	Citoplasma
A0A090NFX8	Threonine--tRNA ligase	threonyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NWK0	Phosphoglycerol transferase I	glucan biosynthetic process	Membrana citoplasmática
A0A090NCG9	Fumarate reductase flavoprotein subunit	anaerobic respiration; electron transport chain	Membrana citoplasmática
A0A090NXA6	Chaperone protein HscA (Hsc66)	iron-sulfur cluster assembly; protein folding	Citoplasma
I6FYD1	Dihydroxy-acid dehydratase (DAD)	isoleucine biosynthetic process; valine biosynthetic process	Citoplasma
A0A236LMC3	Integrase	DNA integration; DNA recombination	-
A0A090NWX7	Arginine--tRNA ligase	arginyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A090NY81	Dihydrolipoyl dehydrogenase	cell redox homeostasis	Citoplasma
I6HBM8	Asparagine--tRNA ligase	asparaginyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma

A0A090NEV1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	protein folding	Citoplasma
A0A090NJ29	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	glutamine metabolic process; GMP biosynthetic process	Citoplasma
A0A090NNW4	Glutathione reductase	cell redox homeostasis; glutathione metabolic process	Citoplasma
A0A090NM54	ATP-dependent RNA helicase SrmB	ribosomal large subunit assembly	Citoplasma
A0A090NYL0	Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	tricarboxylic acid cycle	Citoplasma
I6HIK7	Cysteine desulfurase SCS	[2Fe-2S] cluster assembly	Citoplasma
A0A090NNY4	Aminotransferase	biosynthetic process; cellular amino acid metabolic process	Citoplasma
A0A090NMY9	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	fatty acid biosynthetic process	Citoplasma
A0A090N923	DNA-binding protein parB	-	Citoplasma
I6H021	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2	fatty acid biosynthetic process	Membrana citoplasmática
A0A090NE55	Uncharacterized protein	-	Citoplasma
F3VEG4	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	-	-
A0A090NFI3	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	aromatic amino acid family biosynthetic process; chorismate biosynthetic processes	Citoplasma
A0A1E2VIK7	Phosphoprotein PhoE	ion transport	Membrana extracelular
I6H561	Outer membrane porin protein ompD	ion transport	Membrana extracelular
A0A090NPH9	Outer membrane protein F	ion transport	Membrana extracelular

A0A090NC59	UDP-sugar diphosphatase	nucleotidecatabolicprocess	Periplasma
A0A090NFG8	NADP-dependent l-serinedehydrogenase	-	Citoplasma
A0A090NDW8	Universal stress proteinfamilyprotein	response to stress	Citoplasma
A0A090NYW3	Thioredoxin	cell redox homeostasis	Citoplasma
A0A090NKC2	Nadph:quinoneoxidoreductase	-	Citoplasma
A0A090NC73	Deoxyribose-phosphatealdolase (DERA)	carbohydratecatabolicprocess ; deoxyribonucleotidecatabolic process; deoxyribosephosphatecatabolicprocess	Citoplasma
A0A090NLF0	Succinatedehydrogenaseiron-sulfursubunit	tricarboxylicacidcycle	Membrana citoplasmática
A0A090NIB4	NAD-dependentepimerase/dehydratasefamilyprotein	-	Citoplasma
A0A090NGZ9	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase, symmetrical	-	Citoplasma
A0A090NKQ0	Fe/S biogenesisprotein NfuA	iron-sulfur cluster assembly; proteinmaturation	Citoplasma
A0A090NCP8	Glutaredoxin 2	cell redox homeostasis	Citoplasma
A0A090NE81	Riboflavinsynthase alpha chain	-	Citoplasma
A0A090NCF5	TranscriptionalregulatoryproteinRcsB	phosphorelaysignaltransduction system; regulationoftranscription, DNA-templated; transcription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NFF2	Oligoribonuclease	-	Citoplasma
A0A090NDL6	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase (DHBP synthase)	riboflavinbiosyntheticprocess	Citoplasma

I6HIL2	Ferredoxin, 2Fe-2S type, ISC system	-	Citoplasma
A0A090NCV4	Preproteintranslocasesubunit-likeprotein	-	Citoplasma
A0A090NNV3	Thymidylatekinase	dTDPbiosyntheticprocess	Citoplasma
A0A090NCW5	LexA repressor	DNA repair ; DNA replication; negative regulationoftranscription, DNA-templated; SOS response; transcription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NBW6	Carbonicanhydrolase	carbonutilization	Citoplasma
A0A0H9QSI4	NAD(P)H nitroreductase (Putativeoxidoreductase)	-	-
A0A090NCJ0	Transcriptional repressor mprA	transcription, DNA-templated	Citoplasma
A0A090NI60	Outer-membranelipoproteincarrierprotein	-	Periplasma
A0A090NC22	Regulatorofribonucleaseactivity A	-	Citoplasma
A0A090NAM2	Chaperoneprotein YcdY	cellular response to DNA damagestimulus	Citoplasma
A0A090NND3	NADH-quinoneoxidoreductasechain E	-	Citoplasma
A0A090NET6	Peptidoglycan-associatedlipoprotein	-	Membrana extracelular
A0A090NHM4	G/U mismatch-specific DNA glycosylase	base-excisionrepair, AP site formation	Citoplasma
A0A090NDZ7	dITP/XTP pyrophosphatase	nucleotidemetabolicprocess; purinenucleosidetriphosphate catabolicprocess	Citoplasma

A0A0I1IT73	2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	-	Citoplasma
I6HBK9	Outermembraneprotein A	-	Membrana extracelular
I6H0T1	UPF0304 proteinYfbU	-	Citoplasma
A0A090NGY0	Peptidyl-prolylcis-transisomerase	-	Citoplasma
A0A090NH16	DcrBprotein	-	Periplasma
A0A090NEK4	YedD	-	-
A0A090NEN0	Lipoproteinspr	-	-
A0A090NEA5	PTS system, glucose-specific IIA component	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	Citoplasma
A0A090NLE7	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase)	dUMPbiosyntheticprocess; dUTPmetabolicprocess	-
A0A090NJ17	Peptidyl-prolylcis-transisomerase (PPIase)	proteinfolding	Citoplasma
A0A1E3N1Y3	Elongationfactor Tu (Fragment)	-	Citoplasma
A0A090NVP2	Ecotin	-	Periplasma
A0A090NLU7	S-ribosylhomocysteinelyase	quorumsensing	Citoplasma
A0A0H7HVM7	Phagecapsidprotein	-	-
A0A090NB18	Outermembranelipoprotein	-	Membrana extracelular
A0A090NIU6	Universal stress proteinfamilyprotein	response to stress	Citoplasma
A0A090NMP9	Uncharacterizedprotein	-	-

A0A1S9K7J 7	Universal stress protein F	response to stress	Citoplasma
A0A090NP6 8	Adenosine 5'-monophosphoramidase	-	Citoplasma
A0A090NGL 2	50S ribosomal protein L20	ribosomal large subunit assembly; translation	Citoplasma
A0A090NEZ 2	Ribosome-associated factor Y	primary metabolic process	Citoplasma
A0A090NI81	30S ribosomal protein S21	translation	Citoplasma
A0A090NGM 4	Thioredoxin	cell redox homeostasis; glycerol ether metabolic processes	Citoplasma
A0A090NM9 5	Protein translocase subunit YajC		Membrana citoplasmática
A0A090NEG 0	D-alanyl-D-alanine serine-type carboxypeptidase	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase activity	Membrana citoplasmática
A0A0H8VKH 5	DNA methylase	-	-

Tabela 18: Proteínas intracelulares comuns em meio LB e VC identificadas na cepa de referência *Shigella flexneri* 5a M90T.

ID	Nomenclatura	Processo celular	Localização celular
A0A090NJK 2	30S ribosomal protein in S3	mRNA binding; rRNA binding; structural constituent of ribosome	Citoplasma
A0A090NK5 5	Pyruvate dehydrogenase E1 component	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity	Citoplasma
A0A090N9S 5	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating) activity; alcohol dehydrogenase (NAD) activity;	Citoplasma

metal ionbinding			
A0A090NAQ0	Phosphoenolpyruvate synthase (PEP synthase)	ATP binding; metal ionbinding; pyruvate, waterdikinaseactivity	Citoplasma
I6HBQ5	Formate acetyltransferase	carbohydratemetabolicprocess	Citoplasma
A0A090NKM4	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	glycolyticprocess	Citoplasma
A0A090NI45	RNA polymerase sigma factor RpoD (Sigma-70)	transcriptioninitiationfrombacterial-type RNA polymerase promoter	Citoplasma
A0A235MRG5	Glycyl-radical enzyme activating protein	-	Citoplasma
A0A127GG08	Isoleucine--tRNA ligase	isoleucyl-tRNA aminoacylation	Citoplasma
A0A1E2VG70	DNA polymerase	3'-5' exonucleaseactivity; DNA binding; DNA-directed DNA polymeraseactivity; nucleotidebinding	Citoplasma
A0A090NNF4	Chaperone protein DnaK (HSP70)	ATP binding; unfoldedproteinbinding	Citoplasma
A0A090NAI6	Chaperone protein ClpB	ATP binding	Citoplasma
A0A090NDU7	Exoribonuclease 2	exoribonuclease II activity; RNA binding	Citoplasma
I6FIU0	Glycine--tRNA ligase beta subunit	arginine-tRNA ligaseactivity; ATP binding; glycine-tRNA ligaseactivity	Citoplasma
A0A090NHN9	Elongation factor G (EF-G)	GTPaseactivity; GTP binding; translationelongationfactoractivity	Citoplasma
A0A090NLQ1	Elongation factor 4 (EF-4)	GTPaseactivity; GTP binding; ribosomebinding; translationelongationfactoractivity	Membrana citoplasmática
I6HEV4	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	Citoplasma

A0A090NNT5	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D (EC 1.6.5.11) (NADH dehydrogenase I subunit C/D) (NDH-1 subunit C/D)	NAD binding; NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity; quinone binding	Membrana intracelular
A0A090NB92	60 kDa chaperonin (GroEL protein) (Protein Cpn60)	ATP binding; unfolded protein binding	Citoplasma
A0A090NFF7	ATP synthase subunit alpha	ATP binding; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Citoplasma
A0A090NF86	ATP synthase subunit beta	ATP binding; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Citoplasma
A0A090N9W7	Aspartate ammonia-lyase	aspartate ammonia-lyase activity	Citoplasma
I6H9C9	Trigger factor (TF)	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	Citoplasma
A0A127GHK8	Dihydrolipoyllysine-succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	dihydrolipoyllysine-succinyltransferase activity	Citoplasma
A0A090NWN2	Transcription termination factor Rho	ATP binding; helicase activity; RNA binding; RNA-dependent ATPase activity	Citoplasma
A0A090NIL4	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	IMP dehydrogenase activity; metal ion binding; nucleotide binding	Citoplasma
A0A090NFJ2	Pyruvate kinase		Citoplasma
A0A090NKB7	Biotin carboxylase	ATP binding; biotin carboxylase activity; metal ion binding	Citoplasma

A0A090NJY0	Glutamate--tRNA ligase	ATP binding; glutamate-tRNA ligase activity; tRNA binding; zinc ion binding	Citoplasmă
A0A090NFQ4	Probable cytosolic aminopeptidase	aminopeptidase activity; manganese ion binding; metalloexopeptidase activity	Citoplasmă
A0A090NF53	CTP synthase	ATP binding; CTP synthase activity; metal ion binding	Citoplasmă
A0A090NAI3	Bifunctional protein HldE	ATP binding; heptose-1-phosphate adenyltransferase activity; heptose 7-phosphate kinase activity; phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	Citoplasmă
A0A090NNH5	ABC transporter ATP-binding protein	ATPase activity; ATP binding	Citoplasmă
I6GVN3	Enolase	glycolytic process	Citoplasmă
A0A090NJC3	Peroxi redoxin reductase AhpF subunit	alkyl hydroperoxide reductase activity; electron transfer activity; flavin adenine dinucleotide binding; NAD binding; peroxidase activity; peroxiredoxin activity; protein disulfide oxidoreductase activity	Membrana citoplasmătică
A0A090NM21	Citrate synthase	citrate (Si)-synthase activity	Citoplasmă
A0A090NFC6	Fumarate hydratase class I	4 iron, 4 sulfur cluster binding; fumarate hydratase activity; metal ion binding	Citoplasmă
A0A0I4UQE6	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+)) (KARI)	isomerase activity; ketol-acid reductoisomerase activity; magnesium ion binding; nucleotide binding	Citoplasmă
A0A090NYI2	Glutamine synthetase	ATP binding; glutamate-ammonia ligase activity	Citoplasmă
I6HCD9	Phosphoglycerate kinase	ATP binding; phosphoglycerate kinase activity	Citoplasmă
A0A090NWR7	Fructose-bisphosphate aldolase	fructose-bisphosphate aldolase activity; zinc ion binding	Citoplasmă
A0A090NJ59	DNA-directed RNA	DNA binding; DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity;	Citoplasmă

	polymerasesubunit alpha (RNAP subunit alpha)	proteindimerizationactivity	
A0A090NYB2	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase (AKB ligase)	glycine C-acetyltransferaseactivity; ligaseactivity; pyridoxalphosphatebinding	Citoplasm
A0A090NXY0	Serinehydroxymethyltransferase	glycinehydroxymethyltransferaseactivity; methyltransferaseactivity; pyridoxalphosphatebinding	Citoplasm
A0A090NFB2	Aldose 1-epimerase	aldose 1-epimerase activity; carbohydratebinding	Periplasm
A0A090NFP9	ProteinRecA	DNA recombination, DNA repair.	Citoplasm
A0A090NHY6	Ribosome-bindingATPaseYchF	ATPaseactivity; ATP binding; GTP binding; ribosomalargesubunitbinding; ribosomebinding	Citoplasm
A0A090NKQ8	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase activity	Citoplasm
A0A090NFE7	Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase	NAD binding NADP binding; oxidoreductaseactivity, actingonthealdehydeoroxogroupofdonors, NAD or NADP as acceptor	Citoplasm
I6HBB7	Transaldolase	sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glyceronetransferaseactivity	Citoplasm
A0A090NKL2	Malatedehydrogenase	carbohydratemetabolicprocess; malatemetabolicprocess; tricarboxylicacidcycle	-
R4NJV1	Outermembraneprotein C (Fragment)	porinactivity	Membrana extracelular
A0A090NLB0	ElongationfactorTs (EF-Ts)	translationelongationfactoractivity	Citoplasm
A0A090NET7	Cysteinesynthase	cysteinesynthaseactivity; transferaseactivity	Citoplasm
A0A090NK95	ADP-L-glycero-D-manno-	ADP-glyceromanno-heptose 6-epimerase activity; NADP binding	Citoplasm

heptose-6-epimerase			
A0A090NW23	Glycine--tRNA ligase alpha subunit	ATP binding; glycine--tRNA ligase activity	Cytoplasm
A0A090NAA7	Phosphofructokinase	ATP binding; kinase activity; phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	Cytoplasm
A0A090NKW1	ATP-dependent 6-phosphofructokinase (ATP-PFK)	6-phosphofructokinase activity; ATP binding; metal ion binding	Cytoplasm
A0A090NKJ9	Rod shape-determining protein mreB	-	Cytoplasm
A0A090NL96	Selenide, water dikinase	ATP binding; magnesium ion binding; selenide, water dikinase activity	Cytoplasm
A0A090NKY2	L-threonine 3-dehydrogenase (TDH)	L-threonine 3-dehydrogenase activity; zinc ion binding	Cytoplasm
A0A090NCJ5	PTS system, mannose-specific IIA B component	D-glucosamine PTS permease activity; protein-N(Pi)-phosphohistidine-sugar phosphotransferase activity	Cytoplasm
A0A090NEA6	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase C	nucleic acid binding; protein-glutamine N-methyltransferase activity; site-specific DNA-methyltransferase (adenine-specific) activity	Cytoplasm
A0A090NNW5	Chaperone protein DnaJ	ATP binding; heat shock protein binding; unfolded protein binding; zinc ion binding	Cytoplasm
A0A090NGM3	Fructose-1,6-bisphosphatase class 1 (FBPase class 1)	fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase activity; magnesium ion binding	Cytoplasm
A0A1E3MYP7	Glutathione-dependent reductase	-	Cytoplasm
A0A090NBT2	Branched-chain-amino acid aminotransferase (BCAT)	L-isoleucine transaminase activity; L-leucine transaminase activity; L-valine transaminase activity	Cytoplasm

A0A090NGY4	50S ribosomal protein in L3 glutaminemethyltransferase (L3 MTase)	nucleic acid binding; protein-glutamine N-methyltransferase activity; site-specific DNA-methyltransferase (adenine-specific) activity	Citoplasma
A0A090NXW6	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase (HTPA synthase)	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	Citoplasma
A0A127GTL3	Ribose-phosphate pyrophosphokinase (RPPK)	ATP binding; kinase activity; magnesium ion binding; ribose phosphatediphosphokinase activity	Citoplasma
A0A090NG94	Uncharacterized protein	transferase activity	Periplasma
A0A090NDZ2	Glutathione synthetase	ATP binding; glutathione synthase activity; metal ion binding	Citoplasma
A0A090NNV6	Luciferase-like monooxygenase	monooxygenase activity; oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	Citoplasma
A0A090NG06	UDP-glucose 4-epimerase	galactose metabolic process	Citoplasma
A0A090NDK6	tRNA-cytidine(32) 2-sulfurtransferase	4 iron, 4 sulfur cluster binding; ATP binding; magnesium ion binding; sulfurtransferase activity; tRNA binding	Citoplasma
A0A090ND83	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH) activity	Membrana citoplasmática
A0A090NIB5	Peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase	peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity	Periplasma
I6H0D3	D-galactose-binding periplasmic protein	-	-
A0A1S9JX45	50S ribosomal protein in L2	translation	Citoplasma
A0A090NC11	Acetyl-coenzyme A	acetyl-CoA carboxylase activity; ATP binding; transferase activity	Citoplasma

	carboxylasecarboxyltransferasesubunit alpha		
A0A090NHS4	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	biosyntheticprocess; UDP-glucose metabolicprocess	Citoplasma
A0A090N9L6	Fructosaminekininasefamilyprotein		-
A0A090NI42	Agmatinase	agmatinaseactivity; manganeseionbinding	Citoplasma
A0A090NCI0	33 kDachaperonin	unfoldedproteinbinding	Citoplasma
A0A090NWE3	Thioredoxinreductase	thioredoxin-disulfidereductaseactivity	-
A0A090NGX1	Acetyl-coenzyme A carboxylasecarboxyltransferasesubunit beta	acetyl-CoAcarboxylaseactivity; ATP binding; transferase activity; zincionbinding	Citoplasma
A0A090NER1	Uncharacterizedprotein	-	Periplasma
I6HI12	ProbabletranscriptionalregulatoryproteinYebC	DNA binding	Citoplasma
I6HIK4	Inositol-1-monophosphatase	inositolmonophosphate 1-phosphatase activity; inositolmonophosphate 3-phosphatase activity; inositolmonophosphate 4-phosphatase activity; metal ionbinding	Citoplasma

A0A090NGS1	ProteinFdhE	-	Citoplasma
A0A090NLF9	Methionineaminopeptidase (MAP)	metal ionbinding; metalloaminopeptidaseactivity	Citoplasma
A0A090NC74	Phosphopentomutase	magnesiumionbinding; manganesionbinding; phosphopentomutaseactivity	Citoplasma
A0A235P5M1	Uncharacterized protein	-	-
A0A090NHM5	dTDP-4-dehydrorhamnosereductase	dTDP-4-dehydrorhamnosereductaseactivity	Citoplasma
A0A090NYJ9	30S ribosomal protein in S2	structuralconstituentofribosome	Citoplasma
A0A090NJP2	30S ribosomal protein in S4	rRNAbinding ;structuralconstituentofribosome	Citoplasma
A0A090NJ45	50S ribosomal protein in L3	rRNAbinding; structuralconstituentofribosome	Citoplasma
M1XY95	Aminoglycoside O-phosphotransferaseAPH(3')-IIa	ATP binding; kinaseactivity; phosphotransferaseactivity, alcoholgroup as acceptor	Citoplasma
A0A090NIN2	50S ribosomal protein in L1	rRNAbinding; structuralconstituentofribosome; tRNAbinding	Citoplasma
A0A090NG09	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutaseactivity	Citoplasma
A0A090NKE8	Stringent starvation protein A	-	Citoplasma
A0A1S9J0B2	50S ribosomal protein in L4	translation	Citoplasma

A0A090NNL8	Aerobicrespirat ioncontrolprote inarcA	DNA binding	Citoplasma
A0A090NJH4	Uracilphosphor ibosyltransfera se	GTP binding ;magnesiumionbinding; uracilphosphoribosyltransferaseactivit y	Citoplasma
A0A090NZ63	Transcriptional regulatoryprote inphoP	DNA binding	Citoplasma
A0A090NY98	Transcriptional regulatoryprote inompR	DNA binding	Citoplasma
A0A090NBW8	Ribose-5- phosphateiso merase A	ribose-5-phosphateisomeraseactivity	Citoplasma
A0A090NB63	Peptidyl- prolylcis- transisomeras e	peptidyl-prolylcis- transisomeraseactivity	Citoplasma
A0A090NFZ1	ATP synthasegam machain (ATP synthase F1 sector gammasubunit) (F- ATPasegamm asubunit)	ATP binding; proton-transporting ATP synthaseactivity, rotationalmechanism	Citoplasma
A0A090NWC6	Succinatedehy drogenaseiron- sulfursubunit	2 iron, 2 sulfur cluster binding; 3 iron, 4 sulfur cluster binding; 4 iron, 4 sulfur cluster binding; electrontransferactivity; metal ionbinding; succinatedehydrogenase (ubiquinone) activity	Membrana citoplasmáti ca
A0A090NHQ3	Catabolite gene activator	DNA binding; DNA bindingtranscriptionfactoractivity	Citoplasma
A0A090NKJ1	Toluenetransp ort system Ttg2D protein	-	-
A0A090NCA6	Elongationfact or P (EF-P)	translationelongationfactoractivity	Citoplasma
A0A090NAU5	3-methyl-2- oxobutanoate hydroxymethylt ransferase (EC 2.1.2.11) (Ketopantoate	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferaseactivity; metal ionbinding; methyltransferaseactivity	Citoplasma

	hydroxymethyltransferase) (KPHMT)		
A0A090NXP0	NIF3-related protein	-	Citoplasm
A0A090NYH5	Triosephosphate isomerase (TIM) (TPI)	triose-phosphate isomerase activity	Citoplasm
A0A090NFI1	GTP cyclohydrolase 1	GTP binding; GTP cyclohydrolase I activity; zinc ion binding	Citoplasm
A0A090NDL0	Cystine-binding protein	ionotropic glutamate receptor activity	Periplasm
A0A090NIE4	Peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase	peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity	Citoplasm
I6H2S9	Bacterial extracellular solute-binding proteins, 3 family protein	ionotropic glutamate receptor activity	Periplasm
A0A090NL25	Transcriptional regulatory protein cpxR	DNA binding	Citoplasm
A0A090NLV5	Uridylate kinase (UK)	ATP binding; UMP kinase activity	Citoplasm
A0A090NIY3	50S ribosomal protein in L5	rRNA binding; structural constituent of ribosome; tRNA binding	Citoplasm
A0A090NWB6	Thiol peroxidase (Tpx)	thioredoxin peroxidase activity	Periplasm
A0A090NE91	Superoxide dismutase	metal ion binding; superoxide dismutase activity	Periplasm
A0A090NJ52	50S ribosomal protein in L6	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Citoplasm
A0A090NLF6	Ribosome-recycling factor (RRF) (Ribosome-	-	Citoplasm

	releasing factor)		
A0A127GKI2	Translation initiation factor IF-3	translation initiation factor activity	Citoplasma
A0A090NYW6	Transcription termination/antitermination protein NusG	-	Citoplasma
A0A090NGD8	Inorganic pyrophosphatase	inorganic diphosphatase activity; magnesium ion binding	Citoplasma
A0A090NW82	UPF0234 protein YajQ	-	Citoplasma
A0A090NX78	Thioredoxin/glutathione peroxidase BtuE	glutathione peroxidase activity; peroxidase activity	Periplasma
A0A090NFK8	ElaB protein	ribosome binding	-
A0A142H7J1	Bacterioferritin	ferric iron binding; ferroxidase activity	Citoplasma
A0A0H9UKU6	Flavodoxin	electron transfer activity; FMN binding	Citoplasma
A0A090NJP9	Peptide deformylase (PDF)	metal ion binding; peptide deformylase activity	Citoplasma
A0A090NCU9	Outer membrane protein	-	Membrana extracelular
A0A090NFX7	ATP synthase subunit delta	proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Membrana
A0A090NBG8	Single-stranded DNA-binding protein (SSB)	single-stranded DNA binding	Citoplasma
A0A090NLX4	Outer membrane protein OmpH	unfolded protein binding	Periplasma
A0A090NX20	ATP synthase B chain	hydrogen ion transmembrane transport activity; hydrolase activity	Membrana citoplasmática
A0A090NXC0	Phosphoheptose isomerase	carbohydrate derivative binding; D-sedoheptulose 7-phosphate isomerase activity; zinc ion binding	Citoplasma
A0A090NP71	UPF0227 protein YcfP	-	Citoplasma
A0A090NJL6	RNA polymerase-binding transcription factor DksA	zinc ion binding	Citoplasma

A0A090NW86	ATP-dependent protease subunit HslV	metal ion binding; threonine-type endopeptidase activity	Citoplasm
A0A090NEF2	DNA protection during starvation protein	DNA binding; ferric iron binding; oxidoreductase activity, oxidizing metal ions	Citoplasm
A0A090NCH2	Shikimate kinase 1	ATP binding; magnesium ion binding; shikimate kinase activity	Citoplasm
A0A090NL75	Transcription elongation factor GreA (Transcript cleavage factor GreA)	DNA binding; RNA polymerase binding; translation elongation factor activity	Citoplasm
A0A090NP61	Acyl carrier protein (ACP)	acyl carrier activity	Citoplasm
A0A090NYB8	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	acetyl-CoA carboxylase activity	Citoplasm
A0A0A6ZZC1	Protein translation elongation factor Tu (EF-TU)	GTPase activity; GTP binding; translation elongation factor activity	Citoplasm
A0A090NIY8	30S ribosomal protein S5	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Citoplasm
A0A090NIX9	50S ribosomal protein L16	rRNA binding; structural constituent of ribosome; tRNA binding	Citoplasm
A0A090NF38	Outer membrane protein X		Membrana extracelular
A0A0I1YRX1	50S ribosomal protein L13	structural constituent of ribosome	Citoplasm
A0A090NI38	50S ribosomal protein L10	ribosome biogenesis; translation	Citoplasm
A0A090NY77	Ferric uptake regulation protein	transcription, DNA-templated	Citoplasm
A0A090NCR5	Leucine-responsive regulatory protein	transcription, DNA-templated	Citoplasm

A0A090NIV5	Thioredoxinperoxidase	peroxidaseactivity; peroxiredoxinactivity	Citoplasma
A0A090NNE5	Acetyltransferase	N-acetyltransferaseactivity	Citoplasma
A0A090NCQ3	Ferritin	ferricironbinding	Citoplasma
A0A090NEM8	Xanthinephosphoribosyltransferase	magnesiumionbinding; xanthinephosphoribosyltransferaseactivity	Citoplasma
A0A090NA51	Osmoticallyinduciblelipoprotein E	-	-
A0A090NNG2	30S ribosomalprotein S6	rRNAbinding; structuralconstituentofribosome	Citoplasma
A0A090NJL7	50S ribosomalprotein L17	structuralconstituentofribosome	Citoplasma
A0A090NWX8	Lipoprotein	-	-
A0A090NXH5	Peptidyl-prolylcis-transisomerase	peptidyl-prolylcis-transisomeraseactivity	Periplasma
A0A236Q994	50S ribosomalprotein L15	translation	Citoplasma
A0A090NA33	DNA-bindingprotein	DNA binding; proteindimerizationactivity	Citoplasma
A0A090NJ47	50S ribosomalprotein L22	rRNAbinding; structuralconstituentofribosome	Citoplasma
A0A090NIZ2	30S ribosomalprotein S13	rRNAbinding; structuralconstituentofribosome; tRNAbinding	Citoplasma
Q0T1S7	Autonomousglucyl radical cofactor	catalyticactivity	Citoplasma
A0A090NMD1	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthaseactivity; transferase activity	Citoplasma
A0A090NW17	10 kDachaperonin (GroESprotein) (Protein Cpn10)	ATP binding	Citoplasma
A0A090NDK3	30S ribosomalprotein	structuralconstituentofribosome	Citoplasma

in S16			
A0A090NHZ6	50S ribosomal protein L11	translation	Citoplasm
A0A090NDP8	50S ribosomal protein L19	translation	Citoplasm
A0A090NJ50	50S ribosomal protein L14	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Citoplasm
A0A090NLA3	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	3-hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	Citoplasm
A0A090NXI9	ElaB protein	ribosome binding	-
A0A090NYK0	UPF0325 protein YaeH		Citoplasm
A0A090NG20	Integration host factor subunit alpha (IHF-alpha)	DNA binding	Citoplasm
A0A090NJM6	30S ribosomal protein S10	structural constituent of ribosome; tRNA binding	Citoplasm
A0A090NJB6	30S ribosomal protein S8	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Citoplasm
A0A090NLO0	30S ribosomal protein S9	structural constituent of ribosome	Citoplasm
A0A090NM58	DNA-binding protein	DNA binding; protein dimerization activity	Citoplasm
A0A090NYG5	Translation initiation inhibitor	-	Citoplasm
A0A090NKH0	Rhodanese-related sulfurtransferase	transferase activity	-
A0A090NDG2	Translation initiation inhibitor	-	Citoplasm
A0A090NYO0	30S ribosomal protein S11	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Citoplasm

A0A090NGW9	Uncharacterized protein	-	-
A0A090NGX7	30S ribosomal protein in S20	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NLY5	Transcription antitermination protein NusB (Antitermination factor NusB)	RNA binding	Cytoplasm
A0A090NIM2	50S ribosomal protein in L7/L12	structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NNM3	D-erythro-7,8-dihydroxyheptose triphosphatase (EC 5.-.-.)	dihydroxyheptose aldolase activity; isomerase activity	Cytoplasm
A0A090NNB7	30S ribosomal protein in S18	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NJM9	30S ribosomal protein in S19	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NN74	RNA-binding protein Hfq	RNA binding	Cytoplasm
A0A090NIK4	DNA-binding protein HU	DNA binding	Cytoplasm
A0A090NDK3	30S ribosomal protein in S16	structural constituent of ribosome	Cytoplasm
A0A090NDR2	Thioredoxin	protein disulfide oxidoreductase activity	Cytoplasm

A0A090NLE9	DNA-directed RNA polymerase subunit omega (RNAP omega subunit)	DNA binding; DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity	Citoplasma
A0A090NXA1	Major outer membrane lipoprotein	-	Membrana extracelular
A0A090NEE0	Glutaredoxin	2 iron, 2 sulfur cluster binding; electron transfer activity; metal ion binding; protein disulfide oxidoreductase activity	-
A0A090NF12	DNA-binding protein HU	DNA binding	Citoplasma
A0A090NLH4	50S ribosomal protein L28	structural constituent of ribosome	Citoplasma
A0A090NWR1	Cold shock protein	DNA binding	Citoplasma
A0A090N9T6	Surface presentation of antigen protein nsPaK	-	-
A0A090NGC6	Butyrosin biosynthesis protein BtrG	-	-
A0A090NDE3	Translation initiation factor IF-1	ribosome binding; rRNA binding; translation initiation factor activity	Citoplasma
A0A090NNF1	30S ribosomal protein S15	rRNA binding; structural constituent of ribosome	Citoplasma
D6BHV6	Cys-tRNA(Pro)/Cys-tRNA(Cys) deacylase	aminoacyl-tRNA editing activity; lyase activity	Citoplasma