

Identificação de ATPases do tipo P em esferoplasto de *Salmonella enteritidis*

*Ingrid Silva Correia¹, Weison Lima da Silva², Cecilia Veronica Nunez³,
Elias Cristiano Candido da Silva⁴*

Resumo

As ATPases do tipo P constituem uma importante família de enzimas responsáveis pelo bombeamento de íons através de membranas. A bactéria gram-negativa, *Salmonella enteritidis*, é um patógeno responsável por infecções gastrointestinais em humanos, e diversas doenças em animais. O esferoplasto foi isolado de bactérias crescidas em meio Mueller Hinton por 48 horas. A atividade ATPásica foi ensaiada na presença de, Ca^{+2} , Na^+ , K^+ , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} e Fe^{+2} . A presença de bafilomicina no meio reacional não apresentou efeito significativo. A adição de 10 μM de cálcio livre ao meio reacional ativou em 50% a hidrólise de ATP, e na presença de Ca^{+2} e Calmodulina foi observado um aumento de 7x na atividade. Ensaio de atividade ATPásica realizados com concentrações diferentes de Na^+ e K^+ indicaram que na concentração de 100 mM de NaCl e 20 mM de KCl ocorreu um aumento da hidrólise de ATP, e esta atividade foi inibida por ouabaína. A presença de 25 μM de Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} e Fe^{+2} resultou em um aumento na hidrólise de ATP. Os dados obtidos neste estudo indicam que a bactéria, *S. enteritidis*, possui um sistema de ATPases do tipo P, das subfamílias, P1B, P2B e P2C.

Palavras-Chave: bactérias, calmodulina, metais pesados, vanadato, ouabaína.

Identification of P-type ATPases on *Salmonella enteritidis* spheroplast. The P-type ATPases constitute an important family of enzymes that are responsible for pumping ion across the membrane. The gram-negative bacteria, *Salmonella enteritidis*, is a pathogen responsible for gastric infection in humans, and many diseases in animals. The spheroplast was isolated from bacteria growing in Mueller Hinton medium by 48 hours. ATPase activity was measured in the presence of, Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+} . The presence of bafilomycin in the reaction medium did not present a significant effect. The addition of free

¹ Tecnóloga em Biotecnologia, Lab Bioquímica Molecular, Depto de Ciências Fisiológicas, ICB, UFAM, isc.ingrid2507@gmail.com

² Doutorando do PPGBiotec-UFAM, Lab. Bioprospecção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação, INPA, weisilva3@gmail.com

³ Tecnologista Sênior, Lab. de Bioprospecção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação, INPA, cvnunez@gmail.com

⁴ Professor Associado, Lab. Bioquímica Molecular, Departamento de Ciências Fisiológicas, ICB, UFAM, candido@ufam.edu.br



calcium, 10 μM , in the reaction medium activated in 50% the ATP hydrolysis, and in the presence of Ca^{2+} and Calmodulin was observed an increasing of 7 times in the activity. ATPase activity assays performed with different concentrations of Na^+ e K^+ indicated that with 100 mM NaCl and 20 mM KCl concentrations occurred an increase of ATP hydrolysis, and this activity was inhibited by ouabain. The presence of 25 μM of Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Fe^{2+} resulted in ATP hydrolysis enhancement. The data obtained in this study indicate the bacteria, *S. enteritidis*, has a P-type ATPase system, from subfamilies P1B, P2B e P2C.

Keywords: bacteria, calmodulin, heavy metals, vanadate, ouabain.

1. Introdução

As ATPases do tipo P (EC 7.2.2.) estão presentes em membranas celulares, e integram uma grande família de enzimas transportadoras de cátions, as quais utilizam a energia liberada pela hidrólise da molécula de ATP, para a formação ou manutenção de gradientes químicos, que atuam na regulação do volume celular, excitabilidade das células nervosas, contração, controle do pH intracelular, secreção ácida no estômago, captação de substratos e vias de sinalização (KUHLEBRANDT, 2004; PALMGREN E NISSEN, 2011; NISSEN, 2016).

Até o presente momento já foram descritas cinco subfamílias das ATPases do tipo P, e cada uma delas ainda está dividida em dois ou mais subgrupos, que diferem com relação aos ligantes transportados e a maneira como são regulados (PALMGREN E NISSEN, 2011). As subfamílias P1, P2 e P3 ATPases já estão bem caracterizadas: P1A faz parte de sistemas de transporte de K^+ bacteriano, P1B é responsável pelo efluxo de metais pesados

citoplasmáticos. As P2A e P2B são as bombas de cálcio, comumente conhecidas como Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarcoplasmático (SERCA) e a Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (PMCA); P2C compreende a Na^+ , K^+ -ATPase e a H^+ , K^+ -ATPase que é encontrada principalmente no cólon, estômago e rins; P2D é uma bomba de Na^+ encontrada em fungos e musgos. Por fim, a P3A, uma bomba de H^+ , está presente na membrana plasmática de fungos e plantas (PALMGREN E NISSEN, 2011; PADILLA-BENAVIDES ET AL., 2013; DREES ET AL., 2015; RETAMALES-ORTEGA ET AL., 2016). Todavia, em contraposição com a função de transporte de íons metálicos, as ATPases do tipo P4 catalisam a translocação de fosfolipídios (LOPEZ-MARQUES ET AL., 2014). E as ATPases do tipo P5A constituem uma subfamília ainda não caracterizada, estando presente em todos os organismos eucarióticos, para os quais o substrato transportado permanece sem definição (SORENSEN ET AL., 2015).

A denominação dada a esta família de enzimas _tipo P_, faz referência à reação de fosforilação que ocorre dentro do sítio catalítico entre um resíduo de aspartato (DKTGT) e uma molécula de ATP, uma característica marcante dessas enzimas (CHAN ET AL., 2010; MEADE, 2019; DYLA ET AL., 2019a). O ciclo de transporte é alternado entre dois estados conformacionais E1 e E2 através de intermediários fosfoenzimáticos: E1P (região de alta afinidade) e E2P (região de baixa afinidade), relacionados com a direção do íon transportado. O transporte de íon perfaz-se através de um mecanismo de ping-pong, onde as espécies são transferidas sucessivamente em direções opostas através da membrana de acordo com o modelo de Post-Albers (TOYOSHIMA ET AL., 2011; GARCIA ET AL., 2015; PEDERSEN ET AL., 2019). Além disso, as ATPases do tipo P são inibidas por ortovanadato, um análogo do fosfato no estado de transição (CLAUSEN ET AL., 2016) e mais especificamente temos ouabaína e tapsigargina como inibidores da Na⁺,K⁺ ATPase e SERCA, respectivamente (CHAN ET AL., 2010; MEADE, 2019; DYLA ET AL., 2019a).

Em relação à topologia das ATPases do tipo P, é descrito que estas enzimas possuem um domínio de ligação para ATP (domínio N), um domínio de fosforilação (domínio P) e um domínio atuador (domínio A), sendo estes importantes para o correto funcionamento do ciclo catalítico.

Existem ainda outros dois domínios que são importantes para a atividade dessas enzimas: o domínio T (domínio de transporte), que transporta metais contra o gradiente de concentração, e o domínio S (domínio de suporte), que firma a enzima na membrana durante a mudança de estado conformacional (PALMGREN E NISSEN, 2011; DYLA ET AL., 2019b).

Bactérias do gênero *Salmonella* possuem grande importância científica por ser uma das principais causadoras de infecções gastrointestinais em humanos e por ser um patógeno transmitido através de diversos alimentos (TINDALL ET AL., 2005). Em humanos, a salmonelose ocasiona várias síndromes, tais como: febre entérica, gastroenterite, septicemia, infecções focais e, no caso de algumas cepas tifoides, um estado de portador assintomático. Nos animais, principalmente em aves, a salmonelose avícola, ocasionada pela *Salmonella gallinarum*, se manifesta por quatro formas principais: enterite, septicemia, aborto e transporte assintomático. A partir disso, muitos estudos vêm avaliando a prevalência, a resistência antimicrobiana, a virulência, a capacidade de infecção e a formação de biofilme destes microrganismos (DESAI ET AL., 2013; SATHYABAMA ET AL., 2014; WANG ET AL., 2015).

A *Salmonella* desenvolveu evolutivamente diferentes estratégias para infectar tipos de células específicas, como



as células M, células epiteliais não-fagocíticas, macrófagos e células dendríticas, dentre outras. Sua capacidade de infectar todos os tecidos, incluindo o cérebro, é testemunho do sucesso da *Salmonella* como agente patogênico. Este microorganismo também tem a capacidade de defender-se contra o ataque do sistema imune, inato e adaptativo, do hospedeiro. Além disso, a indisponibilidade de uma vacina segura e eficaz contra *Salmonella* nos revela sua natureza complexa e engenhosa, capaz de driblar as adversidades encontrada nos microambientes que se abriga e infecta (SONI ET AL., 2010).

Devido a esta importância, a compreensão e identificação cinética de quais enzimas ATPásicas estão presentes em *Salmonella enteritidis*, podem fornecer novas pistas para a regulação e função das ATPases, além disso possibilita novas estratégias e aplicações deste tipo de enzima como alvo molecular de produtos biotecnológicos que visem atuar como bactericida ou bacteriostático. O objetivo deste trabalho foi identificar as ATPases do tipo P presentes no esferoplasto de *S. enteritidis* e determinar as condições bioquímicas para a dosagem diferenciada dessas enzimas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste estudo: trifosfato de adenosina (Na_2ATP), ditioneitol (DTT), tris (hidroximetil) aminometano (Tris), ácido etilenoglicol

bis(2-aminoetiléter)N,N,N',N'tetra ácido (EGTA), ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA), polietilenoglicol hexadecil éter (Brij[®]-58), calmodulina, fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), sacarose, cloreto de cálcio, acetato de zinco, , molibdato de amônio, ácido sulfúrico, cloreto de cobalto, foram obtidos da companhia Sigma-Aldrich e ácido ascórbico Biotec Produtos Químicos apresentando o mais alto grau de pureza analítica. As soluções foram preparadas em água ultra pura tipo I (Sistema Milli-Q – Merck Group).

2.2 Crescimento de *Salmonella enteritidis*

2.2.1 Etapa de Reativação:

A *S. enteritidis* (ATCC 13076) foi retirada do criotubo e reativada em Ágar Mueller Hinton, sendo deixada em incubadora vertical (Innova[®]43-New Brunswick) para descanso por 24 horas a 30°C, em placa de Petri.

2.3 Preparação de esferoplastos

As bactérias *S. enteritidis* foram crescidas em meio Mueller Hinton por 48 horas até a D.O de 0.5 em 660 nm, em agitação no shaker orbital (Innova[®]43-New Brunswick) a 150 rpm. Após o final do tempo de crescimento as bactérias foram centrifugadas (rotor R12A3, Centrífuga Hitachi Refrigerada) a 12000g 4 °C por 5 minutos e a seguir o pellet foi ressuspenso em água ultra pura do tipo I e novamente submetido à centrifugação nas condições anteriores. O pellet resultante foi a seguir sonicado (1



pulso por 30 segundos/10x). Após a sonicação, o material foi centrifugado novamente 12000g 4°C por 5 minutos. Em seguida o pellet foi ressuspensionado e homogeneizado em Tris-HCl pH 8,0 25 mM e Sacarose 0,5 M. Após essa etapa o material foi submetido a uma centrifugação a 12000g 4°C por 5 minutos, e em seguida o pellet foi ressuspensionado e homogeneizado em Tris-HCl pH 7,4 50 mM, MgCl₂ 50 mM. Posteriormente o material foi centrifugado a 35000g (rotor R20A2, Centrífuga Hitachi Refrigerada) 4°C por 15 minutos e o pellet obtido nesta última etapa, contendo o esferoplasto, foi recolhido e ressuspensionado em Tris-HCl pH 7,4 50 mM, MgSO₄ 1mM e armazenado em freezer – 80 °C. A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de LOWRY (1951), em termos gerais o rendimento das diversas preparações de esferoplasto apresentaram a concentração de 9 a 10 mg/ml.

2.4 Dosagem de atividade estimulada por prótons

A atividade das ATPases presente no esferoplasto de *S. enteritidis* foi ensaiada em meio de reação contendo: Tampão Acetato pH 5,0 40 mM, MgSO₄ 10 mM, KCl 50 mM, NaN₃ 5mM, NaF 10 mM e 100 µg de esferoplasto. Após o tempo de pré- incubação (20 minutos), a reação foi iniciada com a adição de ATP (3mM). O tempo de reação para a dosagem da atividade enzimática foi de 60 minutos sendo finalizada com a adição de HCl 0,1 N. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi dosado de

acordo com a metodologia Fiske-Subarow (FISKE E SUBBAROW, 1925) com a adição de acetato de zinco e ácido ascórbico conforme Saheki (SAHEKI ET AL., 1985). Os experimentos foram realizados em triplicatas. A atividade ATPásica foi calculada correlacionando a diferença entre dois ensaios em relação ao total de ATPases no esferoplasto (na ausência e na presença dos inibidores). A concentração de Pi foi determinada interpolando os dados com uma curva padrão de KH₂PO₄ (5 a 200 µM).

2.5 Dosagem de atividade estimulada por cálcio

A atividade das ATPases presente no esferoplasto de *S. enteritidis* foi ensaiada em um meio de reação contendo: Tris-HCl pH 7,4 50 mM, KCl 100 mM, EGTA 0,2 mM, MgCl₂ 3 mM, CaCl₂ 10 µM livre e 100 µg de esferoplasto. Após o tempo de pré- incubação (20 minutos), a reação foi iniciada com a adição de ATP (3mM). O tempo de reação para a dosagem da atividade enzimática foi de 60 minutos sendo finalizada com a adição de HCl 0,1 N. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi dosado de acordo com a metodologia Fiske-Subarow (FISKE E SUBBAROW, 1925) com a adição de acetato de zinco e ácido ascórbico conforme Saheki (SAHEKI ET AL., 1985). Os experimentos foram realizados em triplicatas. A atividade ATPásica foi calculada correlacionando a diferença entre dois ensaios em relação ao total de ATPases



no esferoplasto (na ausência e na presença de EGTA). A concentração de Pi foi determinada interpolando os dados com uma curva padrão de KH_2PO_4 (5 a 200 μM). A concentração de Ca^{+2} livre foi calculada conforme o descrito por Inesi (INESI ET AL., 1980).

2.6 Dosagem de atividade estimulada por calmodulina

A atividade das ATPases presente no esferoplasto de *S. enteritidis* foi ensaiada em um meio de reação contendo: Tris-HCl pH 7,4 50 mM, KCl 100 mM, EGTA 0,2 mM, MgCl_2 3 mM, CaCl_2 10 μM livre, 100 μg de esferoplastos e calmodulina (CaM) 4 μg . Após o tempo de pré-incubação (20 minutos) a reação foi iniciada com a adição de ATP (3mM). O tempo de reação para a dosagem da atividade enzimática foi de 60 minutos sendo finalizada com a adição de HCl 0,1 N. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi dosado de acordo com a metodologia Fiske-Subbarow (FISKE E SUBBAROW, 1925) com a adição de acetato de zinco e ácido ascórbico conforme Saheki (SAHEKI ET AL., 1985). Os experimentos foram realizados em triplicatas. A atividade ATPásica foi calculada correlacionando a diferença entre dois ensaios em relação ao total de ATPases no esferoplasto (na ausência e na presença de calmodulina). A concentração de Pi foi determinada interpolando os dados com uma curva padrão de KH_2PO_4 (5 a 200 μM). A concentração de Ca^{+2} livre foi calculada

conforme o descrito por Inesi (INESI ET AL., 1980).

2.7 Dosagem de atividade ATPásica estimulada por sódio e potássio

A atividade das ATPases presente no esferoplasto de *S. enteritidis* foi ensaiada em um meio de reação contendo: Tampão Acetato pH 5,0 40 mM, MgCl_2 3mM, 100 μg esferoplastos e concentrações variáveis de NaCl e KCl, e uma concentração fixa de NaCl 100 mM e KCl 20 mM. Após o tempo de pré-incubação (20 minutos) a reação foi iniciada com a adição de ATP (3mM). O tempo de reação para a dosagem da atividade enzimática foi de 60 minutos sendo finalizada com a adição de HCl 0,1 N. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi dosado de acordo com a metodologia Fiske-Subbarow (FISKE E SUBBAROW, 1925) com a adição de acetato de zinco e ácido ascórbico conforme Saheki (SAHEKI ET AL., 1985). Os experimentos foram realizados em triplicatas. A atividade ATPásica foi calculada correlacionando a diferença entre dois ensaios em relação ao total de ATPases no esferoplasto (na ausência e na presença de íons Na^+ e K^+). A concentração de Pi foi determinada interpolando os dados com uma curva padrão de KH_2PO_4 (5 a 200 μM).

2.8 Dosagem de atividade ATPásica estimulada por metais

A atividade das ATPases presente no esferoplasto de *S. enteritidis* foi ensaiada em um meio de reação contendo: Tampão Acetato pH 5,0 40 mM, NaCl

150 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 5 mM, NaN₃ 5 mM, DTT 10 μM, Cisteína 0,2 mM, Brij® 58 0.02 %, 100 μg de esferoplastos e 25 μM de ZnSO₄, ZnCl₂, MnSO₄, MnCl₂, CoCl₂ ou FeSO₄. Após o tempo de pré-incubação (20 minutos) a reação foi iniciada com a adição de ATP (3mM). O tempo de reação para a dosagem da atividade enzimática foi de 90 minutos sendo finalizada com a adição de HCl 0,1 N. O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi dosado de acordo com a metodologia Fiske-Subbarow (FISKE E SUBBAROW, 1925) com a adição de acetato de zinco e ácido ascórbico conforme Saheki (SAHEKI ET AL., 1985). A atividade ATPásica foi calculada correlacionando a diferença entre dois ensaios em relação ao total de ATPases no esferoplasto (na ausência e na presença dos metais). A concentração de Pi foi determinada interpolando os dados com uma curva padrão de KH₂PO₄ (5 a 200 μM).

2.9 Reagente de Fiske- Subbarow

A solução de dosagem de Pi foi preparada com os seguintes reagentes: Acetato de zinco 15 mM + Molibdato de amônio 35 mM + ácido ascórbico pH 5,0 10% em uma proporção de 1:1:4. Após o término do tempo de reação e a sua respectiva parada com a adição de HCl 0,1 N, a solução de dosagem de Pi, recém preparada, foi adicionada nos tubos experimentais, em uma razão de volume de 1:1. A seguir para a formação e estabilização do complexo molibdato:Pi e a posterior formação de cor, os tubos foram aquecidos à 37°C por 30 minutos. A

leitura foi realizada a 850 nm (Espectrofotômetro UV-Vis Biomate 3 – Thermo Scientific™).

2.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa SigmaPlot versão 11.0 usando o Anova com análise paramétrica pelo Teste de Tukey.

3. Resultados e Discussão

3.1 ATPases do Tipo V

3.1.1 Dosagem de atividade ATPásica em esferoplasto de Salmonella enteritidis estimulada por próton

A manutenção do pH nos compartimentos intracelulares é um dos parâmetros mais bem controlados nas células, sendo crucial para muitos processos biológicos, incluindo tráfego de membrana, degradação de proteínas, energização de sistemas secundários de transporte de íons e outros metabólicos, entrada de vírus e toxinas e transporte acoplado de pequenas moléculas. O transporte de H⁺ para organelas intracelulares é mediado por bombas de prótons dependentes de ATP conhecidas como H⁺-ATPases vacuolar ou V-ATPases. Estas bombas são, portanto, centrais para a homeostase do pH nas organelas. As V-ATPases são compostas de 14 subunidades diferentes que são organizadas em um domínio catalítico de hidrólise de ATP (V₁) e um domínio de translocação de prótons (V_o) que trabalham juntos como uma máquina rotativa. Estas enzimas são expressas em eucarion-

tes, desde leveduras até humanos. A atividade de V-ATPases in vivo é rigidamente regulada por vários mecanismos, incluindo dissociação reversível dos domínios V1 e Vo (ZHANG ET AL., 2008; SUN-WADA E WADA, 2013).

Como pode ser observado na figura 1, a incubação do esferoplasto de *S. enteritidis* em um meio reacional contendo um pH ácido evidenciou uma hidrólise de ATP total (controle). Desta forma, para definir se a atividade ATPásica observada nesta condição experimental foi devido à presença da ATPase do tipo P ou de uma ATPase do tipo V, o ensaio foi realizado na presença de dois inibidores clássicos para estas enzimas. Conforme demonstrado na figura 1, a presença do vanadato, um inibidor das ATPases do tipo P, que elícita o seu efeito por apresentar a formação de complexos pentavalentes que exibem um arranjo estrutural tridimensional bipiramidal trigonal lembrando a estrutura do fosfato e por conseguinte bloqueando a enzima na conformação E2, a saber, (CLAUSEN ET AL., 2016; SAFFIOTI ET AL., 2019), causou uma redução em torno de 50% na atividade ATPásica medida. Todavia, o mesmo ensaio realizado na presença da Bafilomicina A1, um macrolídeo que atua como inibidor específico da ATPase do tipo V, por se ligar na subunidade c (MALVEZAN E NEUFELD, 2015), apresentou nenhuma ação na hidrólise total de ATP. Portanto, o resultado demonstra que: a) no esferoplasto de *S. enteritidis* existe uma

significativa presença de ATPase do tipo P; b) ausência de uma H⁺-ATPase, ou se a mesma se faz presente no esferoplasto, um meio de reação com um pH com características mais ácidas será necessário para a sua ativação c) que os procedimentos adotados para o seu isolamento e obtenção do esferoplasto não apresenta organelas citosólicas de caráter ácido, que possivelmente poderiam levar a erros na interpretação na determinação da atividade enzimática.

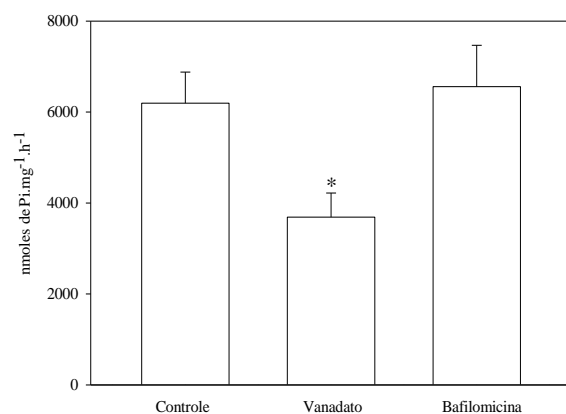


Figura 1 - Medida da atividade ATPásica estimulada por H⁺ em esferoplasto de *S. enteritidis* incubada em meio de reação contendo: Acetato de sódio pH 5,0 40 mM + MgSO₄ 10 mM + KCl 50 mM + NaN₃ 5mM + NaF 10 mM. A concentração de Pi foi dosada de acordo com o descrito na metodologia. As barras representam a média de 4 experimentos realizados em triplicata. *(p < 0.05).

3.2 ATPases do Tipo P 2

3.2.1 Dosagem de atividade ATPásica em esferoplasto de *Salmonella enteritidis* estimulada pelo íon cálcio e calmodulina

O íon Ca⁺² é um sinalizador intracelular universal, e sua importância é

bem descrita em vários processos em células eucarióticas, tais como: morte celular programada, fertilização, secreção, contração ente outros (CHEN ET AL., 2020); e a forma como o seu controle é estabelecido ocorre através de enzimas, tais como: a Ca^{+2} -ATPase de membrana plasmática e a Ca^{+2} -ATPase de retículo sarco/endoplasmático, e outras proteínas transportadoras, que tem sido amplamente estudadas e detalhadas (SMITH E EISNER., 2019; CHEN ET AL., 2020). Todavia, os mecanismos de controle do íon Ca^{+2} em procariotos tem sido pouco estudados, entretanto, ele já foi implicado em processos fundamentais, tais como: o ciclo celular, divisão celular, competência, patogênese, diferenciação celular, motilidade, regulação gênica, entre outros (WHITAKER E LARMAN, 2001; IKURA ET AL., 2002; CHEN ET AL., 2020; HEGEDUS ET AL., 2020). Em *Escherichia coli*, a importância do cálcio já foi descrita para a formação do anel FtsZ, que contem sítios de ligação para cálcio, ocorre *in vitro* na presença de concentrações milimolares de Ca^{+2} (GUEIROS-FILHO, 2007), na atividade e estabilidade de enzimas, muitas das quais são extracelulares, sendo diretamente controladas pela ligação ao íon, por exemplo: subunidade C de ATP-sintase de *E. coli* (VAN WALRAVEN ET AL., 2002); e lipases de *Pseudomonas aeruginosa* (NARDINI ET AL., 2000).

Apesar da importância do Ca^{+2} , até o presente momento, um sistema de transporte deste íon acoplado à hidrólise de ATP em bactérias tem sido pouco

caracterizado, uma vez que grande parte da dinâmica deste íon está sobre controle de proteínas citoplasmáticas e de canais de membrana (ROSCHE ET AL., 2008; GURAGAIN ET AL., 2013; CHANG ET AL., 2014, DOMINGUEZ ET AL., 2015). Por isso, considerando a identificação de uma atividade hidrolítica de ATP atribuída à presença de um ou vários tipos de ATPases do tipo P no esferoplasto de *S. enteritidis*, objetivou-se verificar se a adição do Ca^{+2} estimularia a atividade ATPásica observada anteriormente.

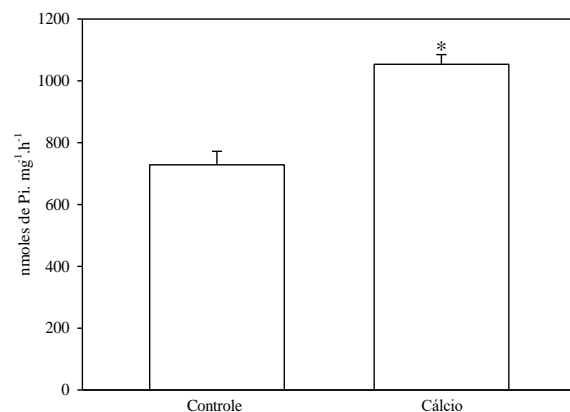


Figura 2 - Medida da atividade ATPásica ativada por cálcio em esferoplasto de *S. enteritidis* incubada em meio de reação contendo: Tris-HCl pH 7,4 50 mM, KCl 100 mM, EGTA 0,2 mM, MgCl_2 3 mM, CaCl_2 10 μM livre. A concentração de Pi foi dosada de acordo com o descrito na metodologia. As barras representam a média de 5 experimentos realizados em triplicata. *($p < 0.05$).

Na figura 2 é demonstrado que a adição de 10 μM de cálcio livre ao meio reacional resultou em um aumento de aproximadamente 50% na hidrólise de ATP, quando comparado ao controle

(metal ausente), e esta ativação não foi observada na presença de EGTA, um quelante específico para íons cálcio; EDTA, utilizado para descartar uma atividade Mg^{+2} -ATPásica, e vanadato. Desta forma, a atividade ATPásica medida fornece evidência da presença de uma Ca^{+2} -ATPase no esferoplasto de *S. enteritidis*.

Em mamíferos a Ca^{+2} -ATPase de membrana plasmática é estimulada pela Calmodulina (CaM) uma proteína pertencente à família do domínio EF hand, de tamanho pequeno (15–22 kDa), e ácida (pI 3,9–4,3). A CaM é uma proteína de ligação de Ca^{+2} que pode interagir com mais de 25 proteínas distintas, regulando assim a atividade de muitas enzimas, incluindo cinases, fosfatases, sintases de óxido nítrico, fosfodiesterases e canais de íons (NITSCHKE ET AL., 2018).

O mecanismo pelo qual a CaM ativa a Ca^{+2} -ATPase de membrana plasmática já está bem caracterizado. No momento da ligação, a calmodulina desloca a porção C-terminal, a proteína adota uma nova conformação, proporcionando uma abertura do sítio de fosforilação no qual o ATP se liga, e assim estimula a atividade da proteína. Em células animais, essas extensões localizam-se na porção C-terminal, enquanto em células vegetais são encontradas na porção N-terminal. A ligação de calmodulina neutraliza a restrição imposta pelo domínio terminal e resulta em uma ativação do bombeamento de Ca^{+2} . O domínio R de ligação à calmodulina regula a velocidade da catálise das P2B-ATPases

e a afinidade da ligação de Ca^{+2} (PALM-GREN E NISSEN, 2011; NITSCHKE ET AL., 2018).

Em sistemas bacterianos já foram descritas a presença de proteínas chamadas de *like-calmodulina*, que estão presentes no citoplasma e se assemelham a calmodulina presente em células de mamíferos (SHARMA E MEENA, 2017). Considerando esta dinâmica, Ca^{+2} -ATPase e calmodulina, a atividade ATPásica estimulada pela presença do íon Ca^{+2} em esferoplasto de *S. enteritidis* foi ensaiada na presença desta proteína. A figura 3, mostra que a adição de 4 μ g de calmodulina ao meio reacional contendo 10 μ M de cálcio livre resultou em um aumento de 7x da atividade de hidrólise de ATP e, assim como na estimulação por cálcio, a ativação observada foi inibida por EGTA e vanadato.

A análise dos dados do experimento de adição de CaM + Ca^{+2} , em conjunto com os dados anteriormente mostrados na figura 2, indica a existência de uma ATPase do tipo P, pertencente à subfamília P2B, uma Ca^{+2} -ATPase, no esferoplasto de *S. enteritidis*, atuando como responsável pelo controle da concentração de íons Ca^{2+} a nível celular, que é aproximadamente 1000 vezes menor do que a concentração externa (ROSCH ET AL., 2008). A ativação vista na presença de calmodulina, pontua também que a nível de organização e disposição da enzima em seus domínios A, P, N, S e T, possivelmente apresenta uma grande

semelhança ao modelo estrutural já proposto na literatura (PALMGREN E NISSEN, 2011; NITSCHKE ET AL., 2018).

A identificação de uma Ca^{2+} -ATPase ativada por calmodulina no esferoplasto de *S. enteritidis* indica a existência das proteínas *like-calmodulina*, que já foram descritas por exercerem um papel fundamental no metabolismo de lipídeos e nos processos de infecção, relacionados à produção de fatores de virulência, tais como, aquisição de ferro, biossíntese de piocianina e proteases (ADVANI ET AL., 2014; SARKISOVA ET AL., 2014; MAYA-HOYOS ET AL., 2019; GUPTA ET AL, 2017).

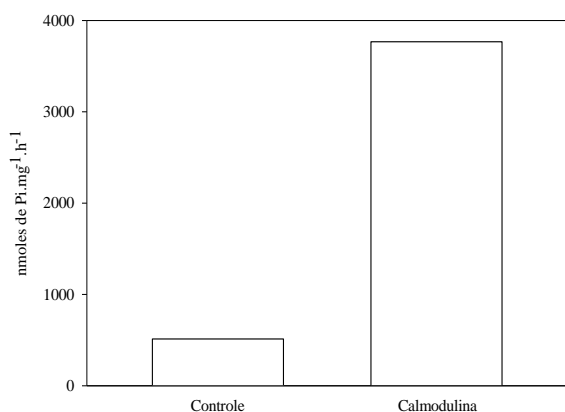


Figura 3 - Medida da atividade ATPásica estimulada por calmodulina em esferoplasto de *S. enteritidis* incubada em meio de reação contendo: Tris-HCl pH 7,4 50 mM, KCl 100 mM, EGTA 0,2 mM, MgCl_2 3 mM, CaCl_2 10 μM livre e 4 μg de calmodulina por 60 minutos. A concentração de Pi foi dosada de acordo com o descrito na metodologia.

Portanto, a presença de uma Ca^{2+} -ATPase sensível à calmodulina, observada neste estudo, demonstra a impor-

tância do controle e regulação da concentração intracelular do íon Ca^{2+} para a ativação de eventos chaves no metabolismo ou nos processos relacionados à virulência bacteriana, fornecendo novas perspectivas a respeito da dinâmica dos processos infecciosos na relação parasita-hospedeiro.

3.2.2 Dosagem de atividade ATPásica em esferoplasto de *Salmonella enteritidis* estimulada pelos íons sódio e potássio

As bactérias estão entre os organismos de crescimento mais rápido e de metabolismo mais ativo, requerendo assim, uma troca rápida de material entre o meio ambiente e o interior bacteriano. Existem, portanto, sistemas de captação de substrato nas membranas bacterianas e muitos destes catalisam um transporte ativo contra o gradiente de concentração utilizando para isto um cátion como força motriz (LIU ET AL., 2017; GUPTA ET AL., 2019). Os íons Na^+ e K^+ são imprescindíveis para essas reações que ocorrem na membrana plasmática. Em *Klebsiella pneumoniae* o citrato, proveniente da fermentação, ativa o transporte de Na^+ para fora através da enzima oxaloacetato descarboxilase, e utiliza o gradiente de íons Na^+ estabelecido para a absorção de citrato (KIM ET AL., 2017). Em *Propionigenium modestum*, a biossíntese de ATP é inteiramente dependente do gradiente de íons Na^+ estabelecido após a descarboxilação de metilmalonil-CoA (VON BALLMOOS ET AL., 2002; MITOME ET AL., 2017).

Por sua vez, os sistemas de importação de potássio celular em bactérias desempenham um papel fundamental na osmorregulação, na homeostase do pH e no potencial de membrana plasmática. O K^+ é um elemento necessário à vida sendo naturalmente abundante, é o principal cátion monovalente intracelular e possui as seguintes funções nas bactérias: (i) é um soluto osmótico, (ii) ativa enzimas intracelulares, (iii) regula o pH interno e (iv) atua como um segundo mensageiro na acumulação de solutos. O acúmulo de K^+ sob condições de estresse permite que os organismos combatam a desidratação, danos à membrana plasmática, executem a regulação das trocas energéticas dependente de Na^+/H^+ e a homeostase do pH (EPSTEIN, 2003).

Como pode ser observado na figura 4, a incubação do esferoplasto de *S. enteritidis* em um meio reacional com concentrações diferentes de sódio e potássio, nas proporções de (1:10) e (1:5) resultou em um estímulo na hidrólise de ATP, quando a concentração no meio de reação foi de 100mM para Na^+ e 20 mM para K^+ . Os dados obtidos neste estudo corroboram com as observações obtidas em *Mycobacterium tuberculosis* onde foi descrito um sistema de transporte de sódio e potássio; e cálcio regulado pelo DosR (um mediador chave da adaptação à "dormência") em resposta a estresses gasosos como a hipóxia que inibe o modo aeróbico de respiração (PULIDO ET AL., 2014).

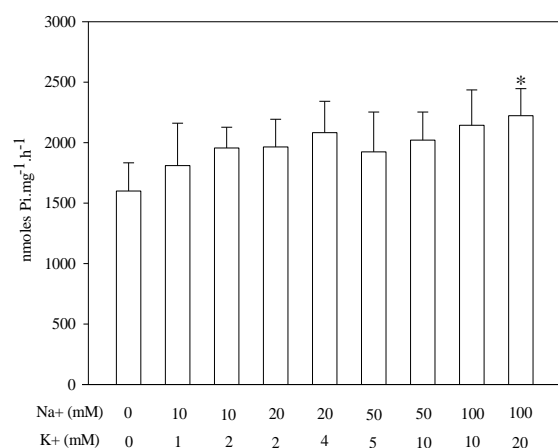


Figura 4 - Medida da atividade ATPásica estimulada por sódio e potássio no esferoplasto de *S. enteritidis* incubada em meio de reação contendo: Acetato de sódio pH 5,0 40 mM, $MgCl_2$ 3 mM e diferentes concentrações de NaCl e KCl por 60 minutos. A concentração de Pi foi dosada de acordo com o descrito na metodologia. As barras representam a média de 5 experimentos realizados em triplicata. * ($p < 0.05$).

A Na^+,K^+ -ATPase interage com uma variedade de substâncias, desde pequenas moléculas, como os esteróides cardíacos (CTSs), até proteínas. Os CTSs, como a ouabaína, derivada de plantas (*Strophanthus gratus*, *Acokanthera schimperi*), e a digoxina, são inibidores específicos da Na^+,K^+ -ATPase (LAURSEN ET AL., 2013; LAURSEN ET AL., 2015; PATEL ET AL., 2019; TRIANA-MARTINEZ ET AL., 2019). Essas moléculas têm sido usadas como drogas no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva por centenas de anos. Eles inibem a enzima quando se ligam ao domínio TM da subunidade α a partir do lado extracelular da bomba e pela estabilização da enzima fosforilada no estado E2 (estado E2P),

antagonizando assim a ligação de K^+ . Propõem-se também que os CTSs afetem as vias de sinalização de cinases utilizando Na^+,K^+ -ATPase como receptor (LINGREL ET AL., 2010; ASKARI, 2019a; BLAUSTEIN E HAMLIN, 2020).

Na figura 5 a presença de ouabaína no meio reacional contendo 100 mM de NaCl e 20 mM de KCl resultou na inibição da hidrólise de ATP, desta forma, indicando a existência de ATPase do Tipo P da subfamília P2C, uma Na^+,K^+ -ATPase, no esferoplasto de *S. enteritidis*, assemelhando-se de forma fisiológica ao sistema ATPásico dos mamíferos.

Os resultados podem indicar a participação da Na^+,K^+ -ATPase na manutenção e equilíbrio nas concentrações de Na^+ e K^+ relacionadas ao equilíbrio iônico e osmótico da célula, bem como o estabelecimento de um gradiente que pode ser acoplado para a obtenção de nutrientes. Além disso, a identificação desta enzima pode direcionar a novos mecanismos e papéis complexos que a bomba de Na^+ e K^+ pode desempenhar na interação entre receptores e ligantes para adaptações fisiológicas, na síntese de ATP ou em vias de sinalização que envolvam a adaptação do parasita à célula hospedeira, escape imunológico, entre outros (MUKHOPADHYAY ET AL., 2018; WONG ET AL., 2018; AMARELLE ET AL., 2019, ASKARI, 2019b; KUMARI ET AL., 2019; LINGEMANN ET AL., 2019).

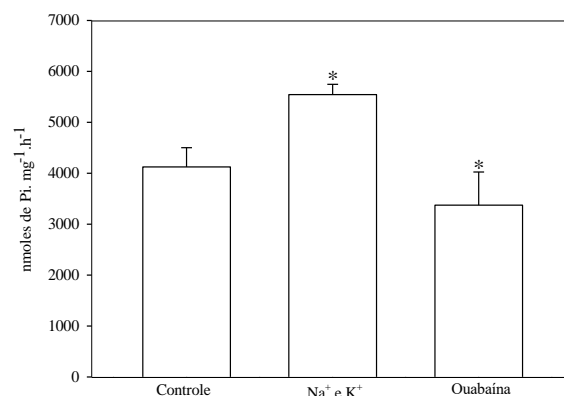


Figura 5 - Medida da atividade ATPásica estimulada por sódio e potássio em esferoplasto de *S. enteritidis* na presença de ouabaína, incubada em meio de reação contendo: Acetato de sódio pH 5,0 40 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM e KCl 20 mM por 60 minutos. A concentração de Pi foi dosada de acordo com o descrito na metodologia. As barras representam a média de 4 experimentos realizados em triplicata. *(p < 0.05).

3.2.3 Dosagem de atividade ATPásica em esferoplastos de *Salmonella enteritidis* estimulada por metais pesados

A homeostase de metais de pesados (Cu^+ , Cd^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2}) é central para a fisiologia bacteriana. Associado às proteínas, esses micronutrientes participam de vias bioquímicas que vão desde a respiração celular até a expressão gênica, sendo componentes estruturais e catalíticos de grande importância para vários dos proteomas bacterianos (SMITH ET AL., 2016; PI E HELMANN, 2017). Tendo em vista que esses processos ocorrem em diferentes compartimentos da célula, a distribuição dos metais e seu direcionamento para as proteínas específicas adquirem

particular relevância. Em contrapartida, a interação dos metais diretamente com o DNA e as proteínas, assim como, sua participação em reações do tipo Fenton, torna-os potencialmente tóxicos quando presentes em níveis elevados no meio celular (SARKAR E ROBERTS, 2011; SHENG ET AL., 2016; SMITH ET AL., 2016). Portanto as bactérias adotam duas estratégias para o controle dos metais pesados, que envolvem, proteínas de ligação aos metais e/ou um sistema de transporte à custa de gasto energético (WIJEKON ET AL., 2017; KURUCZ ET AL., 2018).

Com o objetivo de verificar a possível existência desses transportadores de metais pesados no esferoplasto de *S. enteritidis*, a atividade ATPásica foi ensaiada na presença de diferentes íons: Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} e Fe^{+2} . De acordo com a figura 6, foi observado um aumento na atividade de hidrólise de ATP na presença de uma concentração fixa de 25 μM dos metais testados.

As ATPases do Tipo P_{1B} já foram demonstradas em *E. coli* (ZntA), *Staphylococcus aureus* (CadA), *Pseudomonas putida* e *Cupriavidus metallidurans*, entre outras (MANDAL ET AL., 2002; MANA-CAPELLI ET AL., 2003; HU E ZHAO, 2007; SCHERER E NIES, 2009). Os resultados aqui apresentados também identificaram a existência de uma ATPase do tipo P, da subfamília P_{1B}, e que essa ativação, em relação ao íons Zn^{2+} e Mn^{2+} , foi dependente da forma salina utilizada, evidenciando que a camada de solvatação é um fator

essencial na interação dos íons com a ATPase (GUPTA ET AL, 2019; OSMAN ET AL., 2019).

Diferente das ATPases do tipo P_{2A} e P_{2C} que apresentam uma rigorosa seleção ao íon transportado, baseado em seu tamanho, a P_{1B} apresenta uma seletividade menos rígida, baseada primariamente na coordenação química e geometria com um domínio de ligação aos metais com diferentes números de coordenação, desta forma, os resultados provavelmente indicam a presença de uma única ATPase do tipo P_{1B} capaz de transportar os metais testados, contudo, futuros experimentos deverão ser conduzidos para identificar qual dos metais apresenta uma maior afinidade pela enzima, e assim definir o metal (substrato) primário.

Outro ponto em destaque da identificação da ATPase do tipo P_{1B} no esferoplasto de *S. enteritidis* é a correlação que existe entre a capacidade de “virulência” das bactérias e a atividade dessas enzimas no transporte dos seguintes metais pesados: Cd^{+2} , Cu^{+} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} e Fe^{+2} (ARGUELLO ET AL., 2011; LEON ET AL., 2015; LADOMESKI ET AL., 2017). Portanto, a presença desta ATPase do tipo P, e sua ativação pelos respectivos metais, no esferoplasto de *S. enteritidis* poderá fornecer novas informações a respeito dos processos bioquímicos relacionados à virulência, infecção e escape imunológico (BOTELLA ET AL., 2011; MARTIN ET AL., 2019).

Por fim a presença da ATPase do tipo P₁B também representa um mecanismo para que essa bactéria apresente a capacidade de se estabelecer em ambiente onde a concentração de metais seja muito alta, evidenciando uma vantagem para a colonização de ambientes eutrofizados (CHIEN ET AL., 2013; KURUCZ ET AL., 2018).

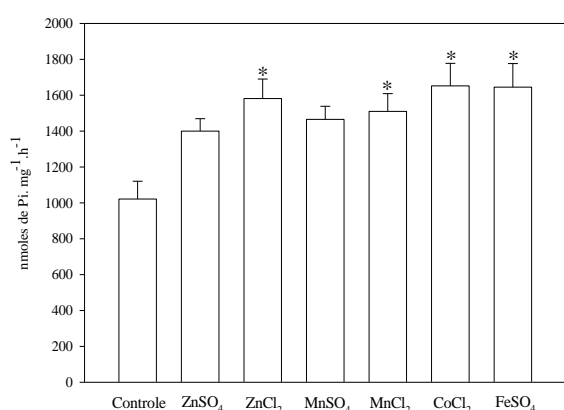


Figura 6 - Medida da ATPásica estimulada por metais em esferoplasto de *S. enteritidis* incubada em meio de reação contendo: Acetato de sódio pH 5,0 40 mM, NaCl 150mM, MgCl₂ 5mM, KCl 5mM, NaN₃ 5mM, Brij 58 0,02%, DTT 10 μM, Cisteína 0,2 mM e 25 μM de cada metal por 90 minutos. A concentração de Pi foi dosada de acordo com o descrito na metodologia. As barras representam a média de 4 experimentos realizados em triplicata. * (p < 0.05).

4. Conclusão

Os resultados apresentados demonstram a identificação de diversas ATPases do tipo P, pertencente as subfamílias: P₁B (Efluxo de metais pesados); P₂B (PMCA), P₂C (Na⁺,K⁺-ATPase) em esferoplasto de *S. enteritidis*, evidenciando a importância do controle de diferentes cátions, que estão relacionados a vários processos bioquímicos essenciais para a manutenção da homeostase desta

bactéria, tais como: (a) ciclo celular e divisão celular, (b) competência, (c) patogênese, (d) motilidade, (e) regulação expressão gênica, (f) produção de metaloenzimas, (g) a captação de soluto, (h) movimento flagelar (i) biossíntese de ATP, dentre outros. Além disso, o tráfico, influxo e efluxo, desses íons e a sua estreita correlação com as enzimas ATPásicas podem representar uma estratégia viável para o desenvolvimento de novos antibióticos e novos fundamentos para a compreensão dos aspectos da interação hospedeiro-patógeno.

Agradecimentos

Laboratórios de Tecnologia do DNA e Purificação de Moléculas – Centro de Apoio Multidisciplinar /UFAM.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

- ADVANI, W. J.; RAJAGOPALAN, W. and REDDY, P. H. Calmodulin-like protein from *M. tuberculosis* H37Rv is required during infection. **Sci. Rep.** 4: 6861, 1-6, 2014.
- AMARELLE, L.; KATZEN, J.; SHIGEMURA, M.; WELCH, L. C.; CAJIGAS, H.; PETERANDERL, C.; CELI, D.; HEROLD, S.; LECUONA, E. and SZNAJDER, J. I. Cardiac glycosides decrease influenza



virus replication by inhibiting cell protein translational machinery. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 316: L1094- 1106, 2019.

ARGUELLO, J. M.; GUERERRO-GONZÁLEZ, M. and RAIMUNDA, D. Bacterial transition metal P1B-ATPases: Transport mechanism and roles in virulence. **Biochemistry.** 50: 9940- 9949, 2011.

ASKARI, A. The other functions of the sodium pump. **Cell Calcium.** 84:102105-25, 2019b.

ASKARI, A. The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies. **Pharmacol Res Perspect.** 7(4): e00505, 2019a.

BLAUSTEIN, M. P. and HAMLIN, J. M. Ouabain, endogenous ouabain and ouabain like-factors: the Na⁺ pump/ouabain receptor, its linkage to NCX, and its myriad functions. **Cell Calcium.** 86:102159-74, 2020.

BOTELLA, H.; PEURON, P.; LEVILLAIN, F.; POIN-CLOUX, R.; POQUET, Y.; BRANDI, I.; WANG, C.; TAILEUX, L.; TILLEUT, S.; CHARRIERE, G. M.; WADELL, S. J.; FOTI, M.; LUGO-VILLARINO, G.; GAO, Q.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; BUTCHER, P. D.; CASTAGNOLI, P. R.; GICQUEL, B. DE CHASTELLIER, C. and NEYROLLES, O. Mycobacterial P1-type mediate resistance to zinc poisoning in human macrophage. **Cell Host & Microbe.** 10: 248- 259, 211.

CHAN, H.; BABAYAN, V.; BLYUMIN, E.; GANDHI, C.; HAK, K.; HARAKE, D.; KUMAR, K.; LEE, P.; LI, T.T.; LIU, H.Y.; LO, T.C.; MEYER, C.J.; STANFORD, S.; ZAMORA, K.S. and SAIER, M.H. JR. The P-type ATPase superfamily. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** 19(1-2): 5-104, 2010.

CHANG, Y.; BRUNI, R.; KLOSS, B.; ASSUR, Z.; KLOPPMANN, E.; ROST, B.; HENDRICKSON, W. A. and LIU, Q. Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. **Science.** 344:1131-1135, 2014.

CHEN, X.; CAO, R. and ZHONG, W. Host calcium channels and pumps in viral infections. **Cell.** 30(9): 1-10, 2020.

CHIEN, C. C.; HUANG, C. H. and LIN, Y. W. Characterization of a heavy metal translocating P-type ATPase gene from an environmental heavy metal resistance *Enterobacter* sp isolated. **Appl Biochem Biotechnol.** 169: 1837- 1846, 2013.

CLAUSEN, J. D.; BUBLITZ, M.; ARNOU, B.; OLESEN, C.; ANDERSEN, J. P.; MOLLER, J. V. and NISSEN, P. Crystal Structure of the Vanadate-Inhibited Ca²⁺-ATPase. **Structure.** Volume 24, Issue 4, p617-623. 2016.

DESAI, P. T.; PORWOLLIK, S.; LONG, F.; CHENG, P.; WOLLAM, A.; CLIFTON, S. W.; WEINSTOCK, G. M. and MC, CLELLAND M. Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. **American Society for Microbiology.** mBio 4, 2013.

DOMINGUEZ, D.C.; GURAGAIN, M. and PATRAUCHAN, M. Calcium binding protein and calcium signaling in prokaryotes. **Cell Calcium.** 57: 151- 165, 2015.

DREES, S. L.; BEYER, D. F.; LENDERS-LOMSCHER, C. and LUBBEN, M. Distinct functions of serial metal-binding domains in the *Escherichia coli* P1 B -ATPase CopA. **Mol Microbiol.** 97(3):423-38, 2015.

DYLA, M.; HANSEN, S.B.; NISSEN, P. and KJAERGAARD, M. Structural dynamics of P-type ATPase ion pump. **Biochem. Soc. Trans.** 7(5): 1247- 1257, 2019a.

DYLA, M.; KJAERGAARD, M.; POULSEN, H. and NISSEN, P. Structure and Mechanism of P-Type ATPase pumps. **Annu Rev Biochem.** 89 (4): 4.1-4.21, 2019b.

EPSTEIN, W. The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.** 293-320, 2003.

FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.** 66(2): 375-400, 1925.

GARCIA, A.; RASMUSSEN, H. and CLARKE, R. A novel kinetic model based on the Albers-Post scheme that mimics the behavior of the Na⁺,K⁺-ATPase *in situ*. **Heart Lung and Circulation.** 24: 224-228, 2015.

GUEIROS-FILHO, F. J. Cell division. In *Bacillus subtilis*: Cellular and Molecular Biology. **Horizon Press.** 2007.

GUPTA, H.; SHRIVASTAVA, S. and SHARMA. A novel calcium uptake transporter of uncharacterized P-type ATPase Family supplies calcium for cell surface integrity in *Mycobacterium smegmatis*. **mBio.** 8:1-17, 2017.



- GUPTA, S.; MERRIMAN, C., PETZOLD, C. J; RALSTON, Y. and FU, D. Water molecules mediate zinc mobility in the bacterial zinc diffusion channel ZIPB. **J. Biol. Chem.** 294(36): 133327-13335, 2019.
- GURAGAIN, M.; LENABURG, D. L.; MORRE, L. S.; REUTLINGER, I. and PATRAUCHAN, M. A. Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* require multiple transporters and modulates swarming motility. **Cell Calcium.** 54:350-361, 2013.
- HEGEDUS, L.; ZAMBO, B., PASZTY, K.; PADANYI, R.; VARGA, K.; PENNISTON, J. T. and ENYEDI, A. Molecular diversity of plasma membrane Ca^{2+} transporting ATPases: Their function under normal and pathological conditions. **Adv. Exp. Med. Biol.** 1131: 93 – 129, 2020.
- HU, N. and ZHAO, B. Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. **FEMS Microbiol Lett**, 267:17-22, 2007.
- IKURA, M.; OSAWA, M. and AMES, J. B. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. **Bioessays.** 24: 625–636, 2002.
- INESI, G.; KURZMACK, M.; COAN, C. and LEWIS, D. E. Cooperativity calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. **J. Biol. Chem.** 255, 3025- 3031, 1980.
- KIM, J. W.; KIM, S.; KIM, S.; LEE, H.; LEE, O. and JIN, M. S. Structural insights into the elevator-like mechanism of the sodium/citrate symporter CitS. **Sci. Rep.** 7(1): 2548- 2558, 2017.
- KUHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nat Rev Mol Cell Biol.** (4): 282-95, 2004.
- KUMARI, N.; SINGH, S.; KMARI, V.; KUMAR, S.; KUMAR, V. and KUMAR, A. Ouabain potentiates the antimicrobial activity of aminoglycosides against *Staphylococcus aureus*. **BMC Complement. Alter. Med.** 19(1): 119 – 121, 2019.
- KURUCZ, V.; BEÁTA, K.; SZIGETI, Z. M.; NAGY, G.; OROSZ, E.; HARGITAI, Z.; HARANGI, S.; WIEBENDA, A.; VRIES, R. P.; POCSI, I. and EMRI, T. Physiological background of the remarkably high Cd^{2+} tolerance of the *Apspergillus fumigatus* Af293 strain. **J Basic Microbiol.** 58(11): 957-967, 2018.
- LADOMERSKY, E.; KHAN, A.; SHANBHAG, V.; CAVET, J. S.; CHAN, J.; WEISMAN, G. A. and PETRIS, M.J. Host and pathogen copper-transporting P-type ATPase function antagonistically during *Salmonella* infection. **Infect. Immun.** 9: 1-9, 2017.
- LAURSEN, M.; GREGERSEN, J.L.; YATIME, L.; NISSEN. P. and FEDOSOVA, N. U. Structure and characterization of digoxin and bufalin-bound Na^+ , K^+ -ATPase compared with the ouabain-bound complex. **PNAS.** 112(6): 1755-1760, 2015.
- LAURSEN, M.; YATIME, L.; NISSEN. P. and FEDOSOVA, N. U. Crystal structure of the high-affinity Na^+ , K^+ -ATPase-ouabain complex with Mg^{2+} bound in cation binding site. **PNAS.** 110(27): 10958 – 10963, 2013.
- LEON-TORRES, A.; APONTE, L. N. and SOTO, C. Y. CtpA, a putative *Mycobacterium tuberculosis* P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. **Biometals.** 28: 713- 724, 2015.
- LINGEMANN, M.; MCCARTHY, T.; LIU, X.; BUCHHOLZ, U. J.; SURMAN, S.; MARTIN, S. E.; COLLINS, P. L. and MUNIR, S. The alpha 1 subunit of the Na,K -ATPase (ATP1A1) is required for macropinocytosis entry of respiratory syncytial virus (VRS) in human respiratory epithelial cells. **Plos Pathog.** 15(8): 1- 37, 2019.
- LINGREL, J. B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain- binding site of the Na , K -ATPase. **Annu Rev Physiol.** 72:395–412, 2010.
- LIU, C. S; BRATTON, B. P.; GITAI, Z. and SHAEVITZ, J.W. The effect of antibiotics on protein diffusion in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. **Plos One.** 12(10): 1- 11, 2017.
- LOPEZ-MARQUES, R. L.; TEORINA, L.; PALMGREN, M. G. and POMORSKI, T. G. P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. **Pflugers Arch, European Journal of Physiology.** 466(7):1227-1240, 2014.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. V.; FARR, R. V. and RANDALL, R. V. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-271, 1951.
- MALVEZAN, C. and NEUFELD, T. P. Bafilomycin A1 disrupt autophagic flux by inhibiting both V-



ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome function. **Autophagy**. 11(8): 1437- 1438, 2015.

MANA-CAPELLI, S.; MANDAL, A. K.; ARGÜELLO, J. M. *Archaeoglobus fulgidus* CopB is a thermophilic Cu²⁺-ATPase: functional role of its histidine-rich-N-terminal metal binding domain. **J Biol Chem**. 278(42):40534-41, 2003.

MANDAL, A. K.; CHEUNG, W. D.; ARGUELLO, J. M. Characterization of a thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. **J Biol Chem**. 7201-8, 2002.

MARTIN, J. E.; LE, M. T. NABIN, B.; CAPDEVILA, D. A.; SHEN, J.; WINKLERS, M. E. and GIEDROC, D. P. A Mn-sensing riboswitch activates expression of a Mn²⁺/Ca²⁺ATPase transporter in *Streptococcus*. **Nuc. Acids Research**. 47(13): 6885-6899, 2019.

MAYA-HOYOS, M.; ROSALES, C.; NOVOA-APONTE, L.; CASTILHO, E. and SOTO, C.Y. The P-type ATPase CtpF is a plasma membrane transporter mediating calcium efflux in *Mycobacterium tuberculosis* cells. **Heliyon**. 5: 1-9, 2019.

MEADE, J.C. P-type ATPase transport in Leishmania and Trypanosoma. **Parasite**. 26: 69-92, 2019.

MITOME, N.; SATO, H.; TOMIYAMA, T.; SHIMABKURO, K.; MATSUNISHI, T.; HAMADA, K. and SUZUKI, T. Identification of aqueous access residues of the sodium half channel in transmembrane helix 5 of the Fo-a subunit of *Propionigenium modestum* ATP synthase. **Biophys. Physicobiol**. 14: 41-47, 2017.

MUKHOPADHYAY, R.; VENKADATRI, R.; KATSNELSON, J. and ARAY-BOGER, R. Digitoxin suppresses human cytomegalovirus replication via Na⁺/K⁺ATPase α 1 subunit-dependent AMP-activated protein kinase and autophagy activation. **J. Virol**. 92(6): e01861-17, 2018.

NARDINI, M. LANG, D. A.; LIEBETON, K.; JAEGER, K. E. and DIJKSTRA, B. W. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation – the prototype for family I.1 of bacterial lipases. **J. Biol. Chem**. 275, 31219–31225, 2000.

NISSEN, P. An introduction of P-type ATPase Research. In: Bublitz, M. (eds) P-type ATPase. **Methods in Molecular Biology**. 1337, Humana Press, New York, 2016.

NITSCHKE, J.; JOSTS, I.; HEIDEMANN, J.; MERTENS, H. D.; MARIC, S.; MOULIN, M.; HAERTLEIN, M.; BUSCH, S.; FORSYTH, V. T.; SVERGUN, D. I.; UETRECHT, C. and TIDOW, H. Structural basis for activation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase by calmodulin. **Communications Biology**. 1:206, 2018.

OSMAN, D.; MARTINI, M. A.; FOSTER, A. W.; CHEN, J.; SCOTT, A. J. P.; MORTON, R. J.; STEED, J. W.; LAURIE-LUKE, E.; HUGGINS, T. G.; LAWRENCE, A. D.; DEERY, E.; WARREN, M. J.; CHIVERS, P. T. and ROBINSON, N. J. Bacterial sensors define intracellular free energies for correct enzyme metalation. **Nat. Chem.Biol**. 15: 241-249, 2019.

PADILLA-BENAVIDES, T.; LONG, J. E.; RAIMUNDA, D.; SASSETTI, C. M. and ARGÜELLO, J. M. A novel P (1B)-type Mn²⁺-transporting ATPase is required for secreted protein metalation in mycobacteria. **J Biol Chem**. 288(16):11334-47, 2013.

PALMGREN, M. G. and NISSEN, P. P-Type ATPases - **Annu. Rev. Biophys** 40:243-66, 2011.

PATEL, C. N.; KUMAR, S. P.; MODI, K. M.; SONI, M. N.; MODI, N. R. and PANDYA, H. A. Cardiotonic steroids as potential Na⁺/K⁺-ATPase inhibitors- a computational study. **J Recept Signal Transduct Res**. 39(3): 226- 234, 2019.

PEDERSEN, B.P.; STOKES, D.L. and APELL, H.J. The KdpFABC complex-K⁺ transport against all odds. **Molec Membr Biol**. 35(1):21- 38, 2019.

PI, H.; and HELMANN, J. D. Ferrous iron efflux system in bacteria. **Metallomics**. 9(7): 840-851, 2017.

PULIDO, P. A.; NOVOA-APONTE, L.; VILLAMIL, N. and SOTO, C. Y. The DosR Dormancy Regulator of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates the Na⁺/K⁺ and Ca²⁺ ATPase Activities in Plasma Membrane Vesicles of Mycobacteria. **Current Microbiology**. 69(5), 604–610, 2014.

RETAMALES-ORTEGA, R.; VIO, C. P. and INESTROSA, N. C. P2C-Type ATPases and Their Regulation. **Mol Neurobiol**. 53(2):1343-54, 2016.



- ROSCH, J. W.; SUBLETT, J.; GAO, G.; WANG, Y-D. and TUOMANEN, E.I. Calcium efflux is essential for bacterial survival in the eukaryotic host. **Mol Microbiol.** 70:435–444, 2008.
- SAFFIOTI, N. A.; DE SAUTU, M.; FERREIRA-GOMES, M. S.; ROSSI, R. C.; BERLIN, J.; ROSSI, J. P. F. C. and MANGIALAVORI, I. C. E2P-like states of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase characterization of vanadate and fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues. **Biochem Biophys Acta Biomembr.** 1861(2): 366-379, 2019.
- SAHEKI, S.; TAKEDA, A. and SHIMAZU, T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measure glycogen phosphorylase activity. **Analytical Biochemistry.** Vol. (148), Issue 2, 277-281, 1985.
- SARKAR, D. and ROBERTS, E. A. The puzzle posed by CMMD1, a newly discovered protein binding Cu (++) . **Metallomics.** 3(1): 20- 27, 2011.
- SARKISOVA, S. A.; LOTLIKAR, S. R.; GURAGAIN, M.; KUBAT, R.; CLOUD, J.; FRANKLIN, M.J. and PATRAUCHAN, M. A. A *Pseudomonas aeruginosa* EF-hand protein, EfhP (PA4107), modulates stress responses and virulence at high calcium concentration. **Plos.** 9(6): e98985- 1-11, 2014.
- SATHYABAMA, S.; KAUR, G.; ARORA, A.; VERMA, S.; MUBIN, N.; MAYILRAJ, S. and AGREWALA, J. Genome sequencing, annotation and analysis of *Salmonella enterica* subspecies salamae strain DMA-1. **Gut Pathog.** 6, p. 8, 2014.
- SCHERER, J. and NIES, D. H. CzCP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. **Mol Microbiol.** 73: 601-621, 2009.
- SHARMA, S. and MEENA, L.S. Potential of Ca^{2+} in *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v pathogenesis and survival. **Appl Biochem Biotechnol.** 181(2): 762 -771, 2017.
- SHENG, Y.; WANG, X.; LIAN, Y.; ZHANG, B.; HE, X.; XU, W. and HUANG, K. Characterization of cadmium resistance *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* strain by antioxidant assays and proteome profiles methods. **Environm. Toxicol and Pharmacol.** 46: 289- 291, 2016.
- SMITH, A. T.; ROSS, O.; HOFFMAN, B. M. and ROSENZWEIG, A. C. Metal selectivity of a Cd-, Co-, and Zn-transporting P_{1B}-ATPase. **Biochemistry.** 56(1):85-95, 2017.
- SMITH, G. L. and EISNER, D. A. Calcium buffering in heart in health and disease. **Circulation.** 139 (20) 2358- 2371, 2019.
- SONI, C. R.; KUMAR, G.; BOLLU, P. C.; SAHOTA, P. and LITOFISKY, N.S. Salmonella brain abscess in a patient on chronic azathioprine therapy for myasthenia gravis: report of an unusual case and review of literature in the postantibiotic era. **J. Neurovirol.** 16(1):83-9, 2010.
- SORENSEN, D. M.; HOLEN, H. W.; HOLEMANS, T.; VANGHELuwe, P. and PALMGREN, M. G. Towards defining the substrate of orphan P5A-ATPases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects.** 1850 (3): 524-535, 2015.
- SUN-WADA, G. H. and WADA, Y. Vacuolar-type proton pump ATPases: acidification and pathological relationships. **Histol Histopathol.** 28:805–815, 2013.
- TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G.M. and EUZÉBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55, pp. 521-524, 2005.
- TOYOSHIMA, C.; KANAI, R. and CORNELIUS, F. First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: New light on the oldest ion pump. **Structure.** 19(12):1732- 1738, 2011.
- TRIANA-MARTINEZ, F.; PICALLOS-RABINA, P.; DA SILVA ALVARES, S.; PIETRACOLA, F.; LLANOSS, S.; RODILLA, V.; SOPRANO, E.; PEDROSA, P.; FERREIROS, A.; BARRADAS, M.; HERNÁNDEZ-GONZÁLES, F.; LALINDE, M.; PRATS, N.; BERNADÓ, C.; GONZÁLES, P.; GÓMEZ, M.; IKONOMOPOULOU, M. P.; FERNÁNDEZ-MARCOS, P. J.; GARCÍA-CABALLERO, T.; DEL PINO, P.; ARRIBAS, J.; VIDAL, A.; GONZÁLEZ-BARCIA, M. SERRANO, M.; LOZA, M. I.; DOMÍNGUEZ, E. and COLLADO, M. Identification and characterization of cardiac glycosides senolytic compounds. **Nat. Commun.** 10(1): 4371, 2019.
- VAN WALRAVEN, S. H.; SCHOLTS, M. J. C.; ZAKHAROV, S. D.; KRAAYENHOF, R. and DILLEY, R. A. pH- dependent Ca^{2+} binding to the Fos-subunit affects proton translocation of the



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 9, n.3, B1-B20, 2020

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910

ATP synthase from *Synechocystis 6803*. **J. Bioenerg. and Biomembr.** 34: 455- 464, 2002.

VON BALLMOOS, C.; APPOLDT, Y.; BRUNNER, J.; GRANIER, T.; VASELLA, A. and DIMROTH, T. Membrane topography of the couple ion binding site Na⁺-translocating F1F0 ATP synthase. **J. Biol. Chem.** 277(5): 3504-3520, 2002.

WANG, C.; ZHU, S.; WANG, X.; FENG, Y.; LI, B.; LI, Y.; JOHNSTON, R. N.; LIU, G.; ZHOU, J. and LIU, S. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* subspecies arizonae str. RKS298. **Stand. Genomic Sci.** 10, 2015.

WHITAKER, M. and LARMAN, M. G. Calcium and mitosis. **Cell Dev Biol.** 12: 53-58, 2001.

WIJEKOON, C. J. K.; UDAGEDARA, S. R.; KNORR, R. L.; DIMOVA, R.; WEDD, A. G. and XIAO, Z. Copper ATPase CopA from *Escherichia coli*: Quantification Correlation between ATPase activity and vectorial copper transport. **J. Am. Chem. Soc.** 139(12): 4266-4269, 2017.

WONG, R. W.; LINGWOOD, C. A.; OSTROWSKI, M. A.; CABRAL, T. and COCHRANE, A. Cardiac glycoside/aglycone inhibit HIV-1 expression by a mechanism requiring MEK1/2 and ERK1/2 signaling. **Sci Rep.** 8(1): 850- 867, 2019.

ZHANG, Z.; ZHENG, Y.; MAZON, H.; MILGROM, E.; KITAGAWA, N.; KISH-TRIER, E.; HECK, A. J.; KANE, P. M. and WILKENS, S. Structure of the yeast vacuolar ATPase. **J Biol Chem.** 283:35983-35995, 2008.