

**ANÁLISES *IN SILICO* DE TRANSPORTADORES ABC CAPTADORES DE
MOLÉCULAS RELACIONADAS AOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM
*Enterobacter cloacae***
***IN SILICO ANALYSIS OF ABC TRANSPORTERS CAPTURING MOLECULES RELATED
TO VIRULENCE FACTORS IN *Enterobacter cloacae****

SILVA, Kaline Martins¹; PRAZERES, Rafaela Aparecida¹; CURCELLI, Felipe²;
CREMONESI, Aline Sampaio³

¹Graduando do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco; ²Professor do Curso de
Medicina Veterinária – Universidade São Francisco; ³Professora do Curso de Biomedicina –
Universidade São Francisco.

kaline.silva@mail.usf.edu.br; rafaela.prazeres@mail.usf.edu.br

RESUMO. Os antibióticos são uma das intervenções mais importantes para controlar doenças ocasionadas por bactérias, porém, seu uso indevido tem promovido resistência bacteriana, tornando-se um problema de saúde global. Os transportadores *ATP-Binding Cassette* (ABC), são um complexo proteico encontrado em todas as células e, nas células procariontes, está ligado com o potencial de patogenicidade. As poliaminas são substâncias necessárias para as bactérias, uma vez que elas participam de várias funções fisiológicas, como a formação de biofilme, crescimento celular, além de contribuir para a patogenicidade de bactérias patogênicas. A bactéria *Enterobacter cloacae*, faz parte do trato gastrointestinal de humanos, porém, em outras partes do organismo ela se mostra patogênica. O objetivo do trabalho foi identificar e caracterizar através de análises *in silico*, transportadores ABC importadores de *Enterobacter cloacae* responsáveis pelo transporte de poliaminas a fim de procurar possíveis estratégias de inibição total ou parcial de suas atividades, em busca de novos alvos terapêuticos para o combate à infecção bacteriana. Foram identificados dois transportadores de poliamina na *Enterobacter cloacae*, PotABCD e PotFGHI, cujas proteínas foram identificadas. A docagem molecular foi feita para as proteínas ligadoras do substrato do transportador e mostrou que a proteína PotF é uma possível proteína ligadora de putrescina, enquanto a proteína PotD possivelmente é uma transportadora de espermidina. Dentre as análises de possíveis inibidores, foi encontrada a cistamina, que pode ser uma possível inibidora de PotF. Nenhum dos inibidores selecionados para a PotD apresentaram docagem satisfatória.

Palavras-chave: Docagem molecular. Antibióticos. Poliaminas.

ABSTRACT. Antibiotics are one of the most important interventions to control diseases caused by bacteria, however, their misuse has promoted bacterial resistance, becoming a global health problem. The carriers *ATP-Binding Cassette* (ABC), are a protein complex found in all cells and, in prokaryotic cells, is linked with the potential for pathogenicity. Polyamines are necessary substances for bacteria, since they participate in several physiological functions, such as biofilm formation, cell growth, in addition to contributing to the pathogenicity of pathogenic bacteria. The bacterium *Enterobacter cloacae*, is part of the gastrointestinal tract of humans, however, in other parts of the body it is pathogenic. The objective of this work was to identify and characterize, through *in silico* analysis, ABC transporters importing *Enterobacter cloacae* responsible for the transport of polyamines in

order to look for possible strategies of total or partial inhibition of their activities, in search of new therapeutic targets to combat bacterial infection. Two polyamine transporters were identified in *Enterobacter cloacae*, PotABCD e PotFGHI, whose proteins were identified. Molecular docking was done for the substrate-binding proteins of the transporter and showed that PotF protein is a possible putrescine-binding protein, while PotD protein is possibly a spermidine transporter. Among the analyzes of possible inhibitors, cystamine was found, which may be a possible inhibitor of PotF. None of the inhibitors selected for PotD showed satisfactory docking.

Keywords: Molecular docking. Antibiotics. Polyamines

INTRODUÇÃO

As bactérias de gênero *Enterobacter* são cepas gram-negativas, anaeróbias facultativas que pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São microrganismos saprófitos no ambiente, sendo encontrados principalmente no solo e esgoto urbano, porém, também são encontradas na microbiota gastrointestinal de animais e humanos (MEZZATESTA *et al.*, 2012). Fora do trato gastrointestinal, a *Enterobacter cloacae* se demonstra um patógeno responsável por diversas infecções, sendo elas, no trato respiratório inferior, trato urinário e intra-abdominal, endocardite, artrite séptica, osteomielite e infecções de pele e tecidos moles (MEZZATESTA *et al.*, 2012).

As bactérias patogênicas necessitam de nutrientes do ambiente para realizar sua proliferação e crescimento e a captação destes é feita principalmente a partir de transportes através da membrana celular. Os transportadores do tipo *ATP-Binding Cassette* (ABC - Conjunto ligador de ATP) formam uma superfamília de proteínas de membrana que realizam o transporte de moléculas e substratos através da membrana, e são subdivididos em sistemas de importação e exportação de substâncias de diferente natureza através da membrana celular (OLIVEIRA; BALAN, 2020). Os transportadores do tipo exportadores são encontrados desde simples procariotos à eucariotos complexos, participando da patogênese e infecção de bactérias, porém, envolvem-se em outros processos como exportação de toxinas e resistência a drogas, reparo do DNA, exportação de peptídeos, proteínas, polissacarídeos e lipídios, além de participar da divisão celular (GEORGE; JONES, 2014; LEWIS *et al.*, 2012; OLIVEIRA; BALAN, 2020). Os transportadores do tipo importadores estão presentes apenas em organismos procariontes e são responsáveis principalmente pela captação e absorção de componentes essenciais para as células como nutrientes fontes em fósforo, nitrogênio, enxofre e outros compostos. Desta forma, a internalização destes compostos favorece uma diversidade de atividades intracelulares envolvidas na virulência e patogênese bacteriana (LOCHER, 2016). A estrutura dos transportadores ABC consiste de dois domínios transmembrana *Transmembrane Domain* (TMDs - Permease), que formam um poro na membrana da célula, possibilitando, de forma seletiva, o transporte de substratos, e dois domínios, altamente conservados, de ligação a nucleotídeos *Nucleotide-Binding Domain* (NDBs - ATPase) que realizam a hidrólise da molécula de trifosfato de adenosina (ATP), fornecendo energia para a translocação do substrato. Ainda, os transportadores do sistema de importação possuem um terceiro componente que é uma proteína ligadora ao substrato (*Substrate-Binding Protein* - SBP) também conhecida como periplasmática, responsável por capturar e entregar o substrato ao domínio transmembrana para a internalização (OLIVEIRA; BALAN, 2020; LOCHER, 2016).

Dentre todos os substratos que as bactérias patogênicas precisam para seu crescimento e proliferação, estão as poliaminas, que são moléculas formadas por duas ou mais frações de amina juntas à cadeia alifática. Bactérias patogênicas dependem da síntese de poliaminas para a patogênese a partir da enzima ornitina descarboxilase presente nos procariotos ou da sua captação do ambiente (PHILLIPS, 2018). Esta preocupação em ter poliaminas de forma constante na célula se dá pela importância destas moléculas na fisiologia e sobrevivência das bactérias, estando envolvida em processos como formação de biofilme, crescimento celular, resistência ao estresse oxidativo e armazenamento de nitrogênio. (MICHAEL, 2016; MILLER-FLEMING *et al.*, 2015). Estudos anteriores descreveram vários transportadores importantes para a virulência em *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* como os transportadores PotABCD e o PotFGHI, responsáveis pelo transporte de espermidina e putrescina, respectivamente em *E. coli*; e SpuDEFGH, no qual, SpuD realiza a captação de putrescina e SpuE promove a captação de espermidina em *P. aeruginosa* (FURUCHI *et al.*, 1991 *apud* KRYSENKO *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2012).

Diante a importância das poliaminas para bactérias patogênicas, o presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar proteínas que constituem os transportadores ABC importadores de poliaminas presentes na bactéria patogênica *Enterobacter cloacae* e a partir de análises *in silico* e a realização de docagem molecular para a predição de possíveis ligantes capazes de inibir parcialmente ou totalmente o transporte de poliaminas.

METODOLOGIA

4.1 Busca e Identificação de Transportadores ABC em *Enterobacter cloacae*

A identificação das proteínas que constituem o transportador ABC de poliaminas da bactéria *Enterobacter cloacae* foi feita a partir do banco de dados online KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - <https://www.genome.jp/kegg/>) e a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - ALTSCHUL *et al.*, 1997) que permitiu a identificação de proteínas homólogas. As sequências de aminoácidos das proteínas homólogas foram alinhadas com as de *Enterobacter cloacae* a partir do programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> - CHENNA *et al.*, 2003) a fim de identificar aminoácidos conservados nas diferentes espécies bacterianas.

4.2 Domínios Transmembrana, Região de Peptídeo Sinal e Domínio de Proteína

As proteínas permeases dos transportadores foram identificadas a partir da análise de domínios transmembrana realizada pelo programa TMHMM (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> - KROGH *et al.*, 2001). O *software* prevê regiões transmembranares com base no método de modelos ocultos de Markov (PATRA, *et al.*, 2020). Já as proteínas periplasmáticas foram identificadas a partir da presença de peptídeo sinal, utilizando o programa SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0> ARMENTEROS *et al.*, 2019). Outros domínios como AAA+ altamente conservado em proteínas ATPases (PUCHADES; SANDATE; LANDER, 2020) podem ser identificados a partir do programa *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART - <http://smart.embl-heidelberg.de/> - LETUNIC; BORK, 2017) que é um programa combinado com o banco de dados Uniprot (LETUNIC; BORK, 2017).

4.3 Modelagem Por Homologia das Proteínas do Transportador ABC e Docagem Molecular

Foi usado o programa HHPRED (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred> - ZIMMERMANN *et al.*, 2018) para realização da modelagem molecular por homologia das proteínas periplasmáticas do transportador ABC de poliaminas da *Enterobacter cloacae* e os modelos gerados foram validados pelo diagrama de Ramachandran e visualizados pelo PyMol (<https://pymol.org/2/> - DELANO, 2002) para a predição do sítio de ligação, a triagem virtual e a estimativa de afinidade de ligação (GUEDES *et al.*, 2014).

Através do software AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/> - TROTT *et al* 2010), foi realizada a docagem molecular que avalia a função de pontuação usada no encaixe proteína-ligante, prevendo o modo de ligação e a afinidade de um ligante em relação a uma proteína (GAILARD, 2018). A Docagem molecular é um método capaz de desenvolver possíveis candidatos a fármacos, no qual utiliza predições de ligação e afinidade entre uma proteína e um ligante. O programa AutoDock Vina se baseia no método de Monte Carlo, o qual apresenta funções de pontuação para estimar a energia livre no receptor e um método exploratório para amostrar o espaço posicional e conformacional do ligante sobre o receptor (GAILARD, 2018; FAN; ZHANG, 2019). As moléculas possíveis de interagir com as SBPs e promover a inibição do transportador foram identificadas a partir de dados na literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Enterobacter cloacae* apresenta dois transportadores completos de captação de poliaminas

Foram identificados dois transportadores ABC do tipo importadores de poliaminas na bactéria *Enterobacter cloacae* (Tabela 1) e as proteínas foram confirmadas a partir da análise por BLAST e programas de análises de domínios. Análises no TMHMM identificaram seis regiões transmembrana nas proteínas PotB, PotC, PotH e PotI, (Figura 1A), indicando que estas proteínas podem ser permeases de transportadores ABC. O programa SignalP 6.0 identificou uma provável região de peptídeo sinal na região N-terminal de ambas as proteínas, sendo na PotD entre os aminoácidos 1 a 19 e na PotF entre os aminoácidos 1 a 26 (Figura 1B). O peptídeo sinal é caracterizado por sequências de aminoácidos curtas, presentes na região N-terminal da proteína, são eles que direcionam as proteínas para a membrana plasmática (TEUFEL, *et al.*, 2022; COCIO, 2016).

Tabela 1 – Informações encontradas no KEGG e o nome das proteínas a partir de análises pelo BLAST.

Nome da bactéria	Código KEGG da proteína	Tipos de proteínas	Nome da proteína	Classificação de transporte
<i>Enterobacter cloacae</i> - enc	ECL_02514	Periplasmática	PotD	Espermidina/Putrescina
	ECL_02513	Permease	PotC	Espermidina/Putrescina
	ECL_02512	Permease	PotB	Espermidina/Putrescina
	ECL_02511	ATPase	PotA	Espermidina/Putrescina
	ECL_02819	Periplasmática	PotF	Putrescina
	ECL_02818	Permease	PotH	Putrescina
	ECL_02817	Permease	PotI	Putrescina
	ECL_02816	ATPase	PotG	Putrescina

Fonte: Próprio autor.

Análise das sequências de aminoácidos das proteínas PotA e PotG resultou na identificação domínio AAA presente nas proteínas ATPases (Figura 1C), além disso estas proteínas apresentam regiões conservadas em ATPases de transportadores ABC como a região *P-loop* que contém a dobra alfa-beta-Rossman formada por motivos de ligação de nucleotídeo de assinatura ABC e as regiões Walker A e Walker B (PINTO, 2015; PUCHADES; SANDATE; LANDER, 2020), sugerindo fortemente que as proteínas PotA e PotG são proteínas ATPases.

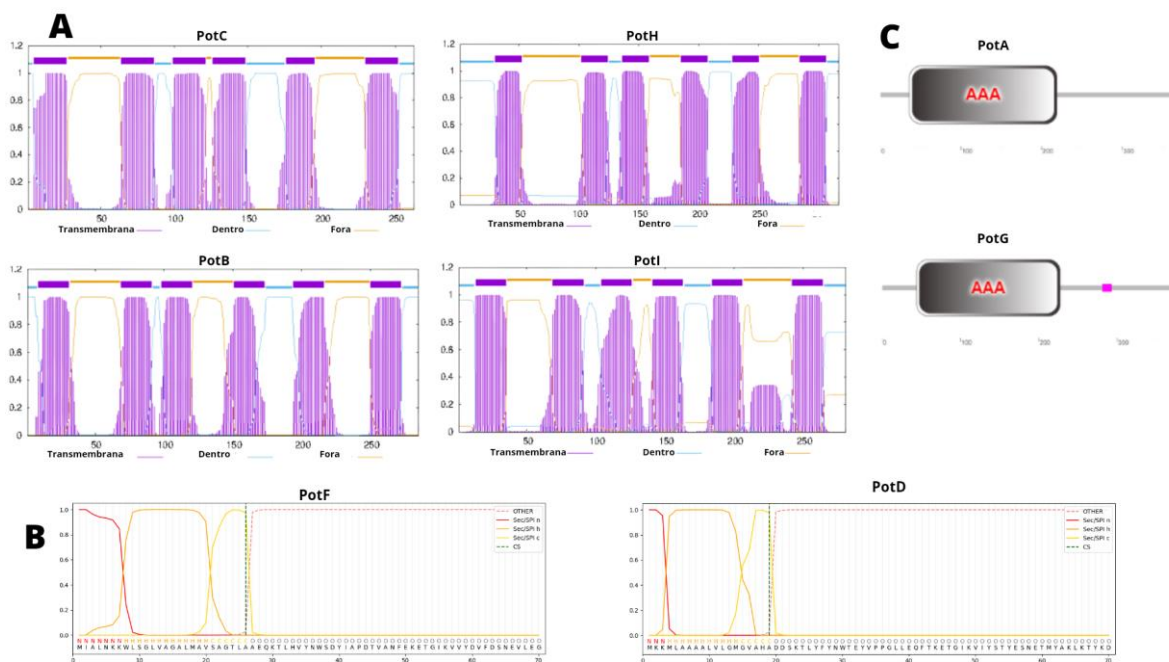


Figura 1: Caracterização das proteínas encontradas no banco de dados KEGG. A: Análise das proteínas de domínio transmembrana (permeases) pelo programa TMHMM, sendo arrematado um gráfico colorido no qual as linhas de cor roxa, representando a região transmembrana na proteína, a linha azul representa a região da proteína que se encontra dentro da bicamada lipídica da membrana representam os aminoácidos que estariam dentro da região transmembrana, já a região que está “vazia” e passando a linha laranja indica os aminoácidos que se encontram fora da região da membrana plasmática; **B:** Análise do peptídeo sinal nas proteínas ligadoras de substrato (periplasmáticas), o início do gráfico apresenta três linhas, sendo elas, em vermelho a região N, em laranja a região H e em amarelo a região C dos aminoácidos que fazem parte da sequência do peptídeo sinal. Através da análise do gráfico foi possível identificar o peptídeo sinal da PotF sendo do aminoácido 1 a 26 e o peptídeo sinal da PotD sendo do aminoácido 1 a 19; **C:** Esquema representando a presença da sequência do domínio AAA presente nas proteínas ligadoras de nucleotídeos (ATPases), portanto a sequência das proteínas PotA e PotG que foram submetidas, possivelmente são proteínas ATPase em seus transportadores. (Fonte: próprio autor)

5.2. As proteínas periplasmáticas conservam aminoácidos do bolsão de interação com poliaminas.

O alinhamento múltiplo de sequências de proteínas periplasmáticas de transportadores de poliaminas de bactérias já estudadas, sendo elas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Xanthomonas citri* e *Pseudomonas aeruginosa*, com as

proteínas PotD e PotF da *Enterobacter cloacae*, permitiu identificar aminoácidos conservados no bolsão de ligação destas proteínas (Figura 2A). As características dos aminoácidos presentes no bolsão de ligação determinam as moléculas que interagem com estas proteínas. Tal interação ocorre de forma específica, ocasionando uma alteração conformacional na proteína, aproximando os dois domínios globulares, passando a proteína de uma conformação aberta, para fechada (CREMONESI *et al.*, 2021; RAHMAN *et al.*, 2021). Os aminoácidos identificados na proteína PotD que constituem seu bolsão de ligação são: W³⁰, T³¹, E³², Y³³, W²²⁵, W²⁵² e D²⁵⁴; e os aminoácidos que constituem o bolsão de ligação da proteína PotF são: W³⁷, S³⁸, D³⁹, Y⁴⁰, W²⁴⁴, D²⁴⁷, F²⁷⁶ e D²⁷⁸. Estudos anteriores realizados nas bactérias *E.coli*, *P.aeruginosa* e *X.citri*, divulgaram a presença de aminoácidos conservados que fornecem uma especificidade de reconhecimento em questão do transporte de espermidina e putrescina, sendo esses, em PotD aparição de uma treonina (T³¹), glutamato (E³²) e um triptofano (W²⁵²) e em PotF a presença da serina (S³⁸), do aspartato (D^{39,247,278}) e da fenilalanina (F²⁷⁶) (WU, *et al.*, 2012; CREMONESI *et al.*, 2021) todos eles observados nas proteínas deste estudo.

A modelagem por homologia consiste em determinar a estrutura tridimensional de uma proteína a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos entre a proteína-alvo com uma ou mais proteínas-molde de estrutura conhecida (WEBB e SALI, 2016; CALIXTO, 2013). Foram identificadas como proteínas-molde para a PotD a proteína PotD de *Escherichia coli* (PDB ID: 1POT), apresentando 100% de identidade de sequência e PotD de *Streptococcus pneumoniae* (PDB ID: 4EQB) com 99.98% de identidade. Para PotF serviram como molde as proteínas PotF de *Escherichia coli* (PDB ID:7OYW), apresentando identidade de 100%; SpuD de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID:3TTN) com 99.97% de identidade e PotF de *Escherichia coli* (PDB ID: 1A99) com 89.80% de identidade.

Estudos anteriores apontaram a construção da arquitetura das proteínas periplasmáticas, uma vez que é comum em proteínas ligadoras de substrato uma estrutura que consiste em dois domínios globulares (Figura 2B) conectado através de dobradiças e é através dessa região de conexão entre os domínios globulares que se pode classificar a proteína entre tipo I, II ou III, portanto, as proteínas periplasmáticas do tipo I apresentam na sua região de dobradiça três fitas beta pregueada. Já as proteínas do tipo II apresentam apenas duas folhas beta pregueadas, por fim a do tipo III conecta as regiões globulares com uma alfa hélice (RAHMAN *et al.*, 2021). As análises da estrutura mostraram que as proteínas PotD e da PotF apresentam duas folhas-beta pregueadas entre os dois domínios, característico de proteínas periplasmáticas do tipo II (Figura 2B), além da forma de dobramento das cadeias polipeptídicas, onde a região N-terminal e C-terminal da cadeia polipeptídica formam o domínio 1 e a região média restante forma o domínio 2 (RAHMAN *et al.*, 2021).

A docagem molecular indicou possível interação entre PotD e espermidina e entre PotF e putrescina (Figura 2C). A literatura atual sobre possíveis ligantes capazes de interagir e inibir a captação de poliaminas é escassa, porém em um estudo foi identificado a molécula cistamina apresentando uma captação competitiva por natureza em relação a putrescina, mostrando-se como uma possível inibidora de seu transporte (HOET, *et al.*, 1993). A docagem molecular determina os melhores ligantes baseados na Energia Livre de Gibbs da interação (SELEGHIM, *et al.*, 2020; FERNANDES, *et al.*, 2018). Ao realizar a docagem molecular na proteína PotF foram gerados nove posições diferentes, destas a cistamina mostrou interação com o bolsão de ligação em três com energia livre de -3,6 (Figura 2C), -3,5, -3.0 . Já a docagem da PotD com os ligantes selecionados não mostrou nenhuma possível interação, ao comparar e observar a tabela que o programa AutoDock Vina resulta, com os

cálculos de energia livre, percebeu-se que todos os ligantes selecionados apresentaram resultados com a energia livre entre receptor-ligante sendo positivos.

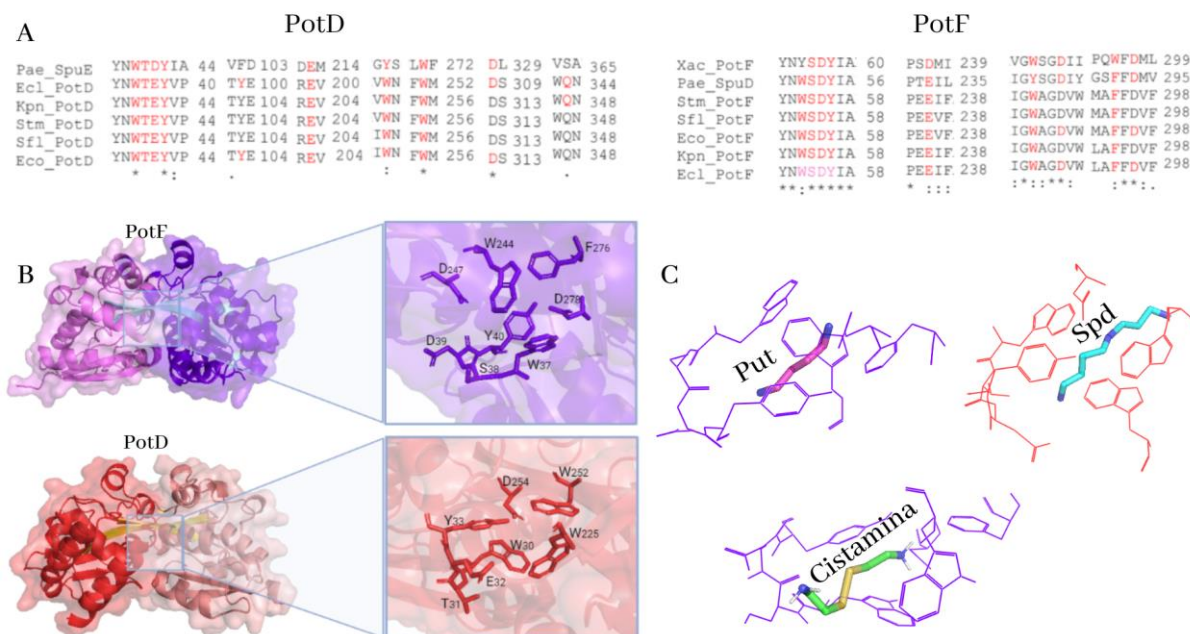


Figura 2: Análise da Modelagem por Homologia e Docagem Molecular. **A:** Alinhamento realizado pelo CLUSTAL, no qual foi possível identificar e destacar em vermelho os aminoácidos que constituem o bolsão de ligação de proteínas em bactérias já estudadas, comparando se há estes mesmos aminoácidos nas proteínas PotD e PotF que estão sendo estudadas. **B:** As figuras à esquerda representam a modelagem das proteínas PotF e PotD, coloridas respectivamente em roxo e vermelho, destacando a região N-terminal e C-terminal, além da presença da folha beta pregueada, onde a PotF está colorido em azul e na PotD em amarelo. A figura à direita é o destaque dos aminoácidos do bolsão de ligação da PotF estão coloridos em roxo, sendo eles: W³⁷, S³⁸, D³⁹, Y⁴⁰, W²⁴⁴, D²⁴⁷, F²⁷⁶ e D²⁷⁸. Já os aminoácidos presentes no bolsão de ligação das PotD coloridos em vermelho, sendo eles: W³⁰, T³¹, E²³, Y³³, W²²⁵, W²⁵² e D²⁵⁴; **C:** Resultado da docagem molecular realizada, na qual a figura com as linhas destacadas em roxo representam a interação entre o bolsão de ligação da PotF e os ligantes, putrescina e cistamina, permitindo a compreensão de que esta proteína é uma possível transportadora de putrescina e a molécula cistamina poderia ser capaz de inibir esse transporte. Já a figura com as linhas destacadas em vermelho representa a interação entre o bolsão de ligação da proteína PotD e o ligante espermidina, podendo observar que esta proteína é capaz de transportar a espermidina. (Fonte: próprio autor)

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, é possível sugerir que existem dois transportadores de poliaminas presentes na bactéria *Enterobacter cloacae*, sendo estes, completos e do tipo importadores, uma vez que, possuem proteínas ATPases, permeases e periplasmáticas, formando os complexos PotABCD e PotFGHI. As proteínas periplasmáticas PotD e PotF estudadas se mostraram altamente conservadas com a maioria das descritas na literatura, apresentando dois domínios globulares ligados por fitas beta-pregueadas. O bolsão

de ligação de ambas proteínas periplasmáticas conservam aminoácidos envolvidos na interação com suas respectivas poliaminas, sugerindo que cada uma transporta uma poliamina diferente, sendo PotD possível captadora de espermidina e a PotF possivelmente captadora de putrescina. Estes achados foram corroborados pela docagem molecular realizada com ambas as proteínas. Ainda, a molécula cistamina foi identificada como um possível inibidor da ação captadora de PotF por apresentar energia livre favorável para interação efetiva com bolsão de PotF. Mais estudos precisam ser realizados para identificar novos inibidores da ação de transportadores ABC em bactérias resistentes e compreender seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ARMENTEROS, JJA.; TSIRIGOS, KD.; SONDERBY, CK.; PETERSIN, TN.; WHINTER, O.; BRUNAK, S.; VOM HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019.

CALIXTO, Paulo Henrique Matayoshi. Aspectos gerais sobre a modelagem comparativa de proteínas. **Ciência Equatorial**, v. 3, n. 1, 2013.

CHENNA, Ramu *et al.* Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3497-3500, 2003.

CREMONESI, Aline Sampaio *et al.* The citrus plant pathogen *Xanthomonas citri* has a dual polyamine-binding protein. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 28, p. 101171, 2021.

COCIO, Tiago Alexandre. Caracterização funcional do gene codificador de uma proteína com peptídeo sinal, masA, de *Aspergillus fumigatus*. 2016. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

DELANO, W.L. The PyMol Molecular Graphics System DeLano Scientific, 2002.

OLIVEIRA, Marcelo Cassio Barreto; BALAN, Andrea. The ATP-binding cassette (ABC) transport systems in *Mycobacterium tuberculosis*: structure, function, and possible targets for therapeutics. **Biology**, v. 9, n. 12, p. 443, 2020.

FAN, Jiyu; FU, Ailing; ZHANG, Le. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83-89, 2019.

FERNANDES, Mariana Sabo *et al.* Estudos de planejamento de ecdiesteróides com ação analgésica potencial: docking molecular e de farmacóforo. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal do Pampa. 2018.

GAILARD, Thomas. Avaliação do AutoDock e AutoDock Vina no benchmark CASF-2013. **Revista de informação química e modelagem**, v. 58, n. 8, pág. 1697-1706, 2018.

GEORGE, A. M.; JONES, P. M. Bacterial Membranes: Structural and Molecular Biology, 1^o Edição. **Editora Caister Academic Press, Norfolk, U.K.**, p. 227-248, 2014.

GUEDES, Isabella A.; DE MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-87, 2014.

HOET, P. H. *et al.* Kinetics and cellular localisation of putrescine uptake in human lung tissue. **Thorax**, v. 48, n. 12, p. 1235-1241, 1993.

KROGH, Anders *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

KRYSENKO, Sergii; WOHLLEBEN, Wolfgang. Polyamine and Ethanolamine Metabolism in Bacteria as an Important Component of Nitrogen Assimilation for Survival and Pathogenicity. **Medical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 40, 2022.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D493-D496, 2017.

LEWIS, V. G.; WEEN, M. P.; MCDEVITT, C. A. The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. **Protoplasma**, v. 249, p. 919-942, 2012.

LOCHER, K. P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, p. 487-493, 2016.

MEZZATESTA, Maria Lina; GONA, Floriana; STEFANI, Stefania. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 7, n. 7, p. 887-902, 2012.

MICHAEL, A. J. Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, 14896– 14903 2016.

MILLER-FLEMING, L., OLIN-SANDOVAL, V., CAMPBELL, K. & RALSER, M. Mistérios restantes da biologia molecular: o papel das poliaminas na célula. **Journal of Molecular Biology**, v. 427 , 3389-3406 2015.

PATRA, P., MONDAL, N., PATRA, B.C. *et al.* Epitope-Based Vaccine Designing of *Nocardia asteroides* Targeting the Virulence Factor Mce-Family Protein by Immunoinformatics Approach. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, 1165–1176 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09921-4>

PINTO, Aline Sampaio. Caracterização estrutural e análises funcionais das proteínas periplasmáticas NrtT e PotF de transportadores do tipo ABC de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. 2015. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

PHILLIPS, M.A. Polyamines in protozoan pathogens. **Journal of Biological Chemistry**, v.293, p.18746-18756, 2018.

PUCHADES, Cristina; SANDATE, Colby R.; LANDER, Gabriel C. Os princípios moleculares que regem a atividade e a diversidade funcional das proteínas AAA+. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 1, pág. 43-58, 2020.

RAHMAN, Mohammad M.; MACHUCA, Mayra A.; ROUJEINIKOVA, Anna. Bioinformatics analysis and biochemical characterisation of ABC transporter-associated periplasmic substrate-binding proteins ModA and MetQ from *Helicobacter pylori* strain SS1. **Biophysical Chemistry**, v. 272, p. 106577, 2021.

SELEGHIM JUNIOR, Paulo. Termodinâmica das reações químicas: energia livre de Gibbs e exergia química: aula 19. **Termodinâmica das reações químicas: energia livre de Gibbs e exergia química: aula 19**, n. 25 jun 2020, 2020.

TEUFEL, Felix *et al.* SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature biotechnology**, p. 1-3, 2022.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current protocols in bioinformatics**, v. 54, n. 1, p. 5.6. 1-5.6. 37, 2016.

WU, D. H.; LIM, S. C.; DONG, Y. H.; WU, J. E.; TAO, F.; ZHOU, L.; ZHANG, L. H.; SONG, H. W. Structural basis of substrate binding specificity revealed by the crystal structures of polyamine receptors SpuD and SpuE from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Molecular Biology**, v. 416, p. 697-712, 2012.

ZIMMERMANN, Lukas *et al.* A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. **Journal of molecular biology**, v. 430, n. 15, p. 2237-2243, 2018.