



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia**  
**Aplicadas à Farmácia**

**FERNANDA ZANI MANIERI**

**Estudo da motilidade bacteriana e o papel do flagelo na função da proteína VisP durante a sinalização química e a patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**

Araraquara - SP

2017

**FERNANDA ZANI MANIERI**

**Estudo da motilidade bacteriana e o papel do flagelo na função da proteína VisP durante a sinalização química e a patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Mestra em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira

Araraquara - SP

2017

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Manieri, Fernanda Zani  
**M278e** Estudo da motilidade bacteriana e o papel do flagelo na função da proteína VisP durante a sinalização química e a patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium / Fernanda Zani Manieri. – Araraquara, 2017.  
14 + 57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Microbiologia.

Orientador: Cristiano Gallina Moreira.

1. Patogenicidade. 2. Flagelo. 3. Motilidade. 4. Virulência. 5. Sinalização química I. Moreira, Cristiano Galina, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

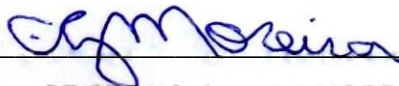
FERNANDA ZANI MANIERI

Estudo da motilidade bacteriana e o papel do flagelo na função da proteína VisP durante a sinalização química e patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Araraquara, 19 de maio de 2017.

BANCA EXAMINADORA



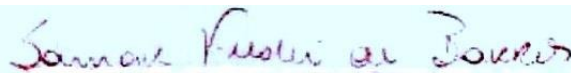
---

CRISTIANO GALLINA MOREIRA



---

ANA MARISA FUSCO ALMEIDA



---

SAMAR FRESCHI DE BARROS

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o incentivo e ajuda para que ele se tornasse possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, professor Cristiano Gallina Moreira, pela oportunidade de trabalho, pela paciência, dedicação e tempo concedidos.

A todos os meus amigos e familiares, pela compreensão da importância que este trabalho tem para mim e pelo apoio nos momentos mais difíceis, sou grata por toda a trajetória.

À FAPESP (processo nº 2014/06779-2) e CNPq pelo apoio institucional e financeiro para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP de Araraquara, por todas as experiências adquiridas, pelo conhecimento propagado e parcerias.

“Um barco, no ancoradouro, está seguro. Mas não é para isso que os barcos são feitos.”

William Shedd

## RESUMO

*Salmonella* Typhimurium é um patógeno causador de gastroenterite em humanos e outros mamíferos, e sua habilidade de invadir as células epiteliais e replicar-se dentro de macrófagos a torna um importante modelo de estudo de mecanismos de virulência e interação patógeno-hospedeiro. O estudo desta interação baseia-se na sinalização química via hormônios do hospedeiro e do patógeno, e durante a investigação destes processos foi detectada uma nova proteína denominada VisP, relacionada a funções celulares diversas como manutenção de membrana, metabolismo, virulência bacteriana e resposta ao estresse. A motilidade via flagelos, importante na colonização e exploração de novos nichos, é um dos importantes mecanismos de patogenicidade bacteriana durante o processo de infecção. O objetivo deste trabalho foi investigar a motilidade mediada por flagelos e seu funcionamento em *S. Typhimurium*, bem como a participação de VisP durante o processo. Para isso, foram feitos ensaios de motilidade, análise da expressão gênica de genes alvos importantes para a patogênese, expressão da flagelina FliC e microscopia em cada um dos mutantes isogênicos comparados à cepa selvagem. Foi evidenciado que a retirada do gene *visP* afeta a motilidade de *S. Typhimurium*, bem como promove um desequilíbrio na homeostase da membrana celular, gerando um aumento exacerbado de flagelina através de um mecanismo ainda não elucidado. A compreensão destes processos é essencial para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro, e contribui para o desenvolvimento de novas tecnologias e terapias.

**PALAVRAS-CHAVE:** Patogenicidade. Flagelo. Motilidade. Virulência. Sinalização química.



## **ABSTRACT**

*Salmonella* Typhimurium is a pathogen that promotes gastroenteritis in humans and mammals, and its ability to invade epithelial cells and replicate inside macrophages makes *Salmonella* an important model for the study of virulence and host-pathogen interactions. This interaction is based on chemical signaling via host and pathogen hormones, and during this investigation a novel protein named VisP was described. This protein is related to diverse cell processes as membrane maintenance, metabolism, virulence and stress response. Flagellar motility, which is important for colonization and exploration of new niches, is one of the bacterial pathogenicity mechanisms that occurs during infection. The aim of the study was to investigate flagellar motility and its operation in *S. Typhimurium* and verify the participation of VisP protein during this process. Motility assays, gene expression analysis of target genes important for pathogenesis, expression of FliC protein and microscopy were performed with the isogenic mutants comparative to the wild type. The results demonstrated that the *visP* gene impacts motility in *S. Typhimurium*, promoting a misbalance in cellular membrane and increasing levels of flagellin via an unknown mechanism. The elucidation of these processes is essential to understanding host-pathogen associations, and contributes to the development of novel technologies and therapies.

**KEYWORDS:** Pathogenicity. Flagella. Motility. Virulence. Chemical signaling.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Diferentes níveis de regulação de <i>rpoS</i> sob diferentes condições de estresse.....	20
<b>Figura 2.</b> Estrutura da proteína VisP .....	21
<b>Figura 3.</b> Organização dos operons de <i>visP/ygiV</i> e <i>qseBC</i> .....	21
<b>Figura 4.</b> Distribuição das cadeias de antígeno-O em <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	24
<b>Figura 5.</b> Sistemas de dois componentes de quimiotaxia.....	26
<b>Figura 6.</b> Esquema representativo do flagelo em <i>Salmonella</i> e suas estruturas .....	29
<b>Figura 7.</b> Esquema da regulação gênica flagelar e montagem do flagelo .....	31
<b>Figura 8.</b> Ensaio do tipo <i>swimming</i> em LB 1% NaCl .....	38
<b>Figura 9.</b> Ensaio do tipo <i>swimming</i> em LB 2% NaCl .....	39
<b>Figura 10.</b> Ensaio do tipo <i>swarming</i> em LB 1% NaCl .....	40
<b>Figura 11.</b> Ensaio do tipo <i>swarming</i> em LB 2% de NaCl .....	41
<b>Figura 12.</b> Expressão relativa de <i>fliC</i> em LB 1% NaCl .....	42
<b>Figura 13.</b> Expressão relativa de <i>fliC</i> em LB 2% NaCl .....	43
<b>Figura 14.</b> Expressão relativa de <i>cheA</i> .....	44
<b>Figura 15.</b> Expressão relativa de <i>cheZ</i> .....	45
<b>Figura 16.</b> Expressão relativa de <i>rpoS</i> .....	46
<b>Figura 17.</b> Expressão relativa de <i>envZ</i> .....	46
<b>Figura 18.</b> Expressão relativa de <i>flgM</i> .....	47
<b>Figura 19.</b> Expressão relativa de <i>qseC</i> .....	48
<b>Figura 20.</b> Expressão relativa de <i>visP</i> .....	49
<b>Figura 21.</b> SDS-PAGE do lisado bacteriano .....	50
<b>Figura 22.</b> SDS-PAGE feito a partir do extrato proteico .....	51
<b>Figura 23.</b> Expressão de FliC e RpoA no lisado bacteriano .....	52
<b>Figura 24.</b> Expressão de FliC e RpoA no extrato proteico.....	52

<b>Figura 25.</b> Expressão de FliC no extrato proteico.....	53
<b>Figura 26.</b> Quantidade média de bacilos longos por campo.....	54
<b>Figura 27.</b> Quantidade média de células imóveis por campo .....	54

## **Lista de Tabelas e Quadros**

<b>Quadro 1.</b> Cepas bacterianas utilizadas neste estudo .....	33
<b>Quadro 2.</b> Quantificação de proteínas totais .....	35

## Lista de Abreviaturas

BOF .....	<i>Binding Oligosaccharide/nucleotide Folding</i>
BSA .....	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CheAB .....	Sistema de dois componentes de quimiotaxia
CheYZ .....	Sistema de dois componentes de quimiotaxia
DO600 .....	Densidade ótica a 600 nm
EHEC .....	<i>Enterohaemorrhagic Escherichia coli</i>
EPEC .....	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
Epi .....	Epinefrina
EROs .....	Espécies Reativas de Oxigênio
IL-1 $\beta$ .....	Interleucina 1 $\beta$
kDa .....	quilodaltons
LB .....	Meio Luria-Bertani
LEE .....	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
LPS .....	Lipopolissacarídeo
MCP .....	<i>Methyl-accepting chemotaxis protein</i>
NaCl .....	Cloreto de sódio
NAG .....	N-acetilglicosamina
NAM .....	N-acetilmurâmico
NGAL .....	Lipocalina 2
Nor .....	Norepinefrina
PAMP .....	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS .....	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST .....	<i>Phosphate buffered saline Tween</i>
PF .....	<i>Periplasmic flagella</i>
PMF .....	<i>Proton Motive Force</i>
PMSF .....	<i>Phenilmethylsulfonyl fluoride</i>

PhoPQ.....	Sistema de dois componentes de enterobactérias
QseBC.....	Sistema de dois componentes de Escherichia coli
QseEF .....	Sistema de dois componentes de Escherichia coli
qRT-PCR.....	<i>Quantitative Real-Time PCR</i>
SCV .....	<i>Salmonella Containing Vacuole</i>
SDS-PAGE.....	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
S. Enteritidis .....	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis
SPI-1 .....	<i>Salmonella Pathogenicity Island 1</i>
SPI-2 .....	<i>Salmonella Pathogenicity Island 2</i>
SsrAB .....	Sistema de dois componentes de Salmonella
S. Typhi .....	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhi
S. Typhimurium .....	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium
T3SS .....	<i>Type 3 Secretion System</i>
TLR-4 .....	<i>Toll-like receptors 4</i>
TLR-5 .....	<i>Toll-like receptors 5</i>
TNF- $\alpha$ .....	<i>Tumoral Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
UPEC .....	<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>
UV .....	Ultravioleta
WT.....	<i>Wild Type</i>
x g .....	Unidade de força centrífuga
$\Delta\Delta C_t$ .....	<i>Comparative critical threshold</i>
$\sigma_{28}$ .....	Fator sigma 28
$\sigma_{70}$ .....	Fator sigma 70
$\sigma_S$ .....	Fator sigma S

## Sumário

1. Introdução.....	15
1.1. Patogenicidade em <i>Salmonella</i> .....	15
1.2. Sinalização química.....	17
1.3. Estresse bacteriano.....	19
1.4. VisP.....	20
1.5. Lipopolissacarídeo.....	22
1.6. Quimiotaxia.....	24
1.7. Motilidade.....	26
1.8. Flagelos em <i>Salmonella</i> .....	28
2. Objetivos.....	32
3. Material e métodos.....	32
3.1. Delineamento experimental.....	32
3.1.1. Cultivo e armazenamento de bactérias.....	32
3.1.2. Ensaio de motilidade.....	33
3.1.3. Extração de RNA.....	34
3.1.4. Análise de expressão gênica via qRT-PCR.....	34
3.1.5. Extração de proteínas totais e quantificação proteica.....	34
3.1.6. SDS-PAGE.....	35
3.1.7. <i>Western blot</i> .....	36
3.1.8. <i>Imunoblot</i> .....	36
3.1.9. Microscopia.....	37
3.1.10. Análise estatística.....	37
4. Resultados.....	37
4.1. Ensaio de motilidade.....	37
4.2. Análise da expressão gênica.....	41
4.3. Extratos proteicos.....	49
4.4. <i>Western blot</i> e <i>imunoblot</i> .....	51
4.5. Microscopia.....	53
5. Discussão.....	55
6. Conclusões.....	62
Referências.....	63

## 1. Introdução

O gênero *Salmonella* é composto por um grupo de bactérias Gram negativas, móveis, pertencentes à família Enterobacteriaceae e predominantemente patogênicas. Atualmente compreende duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo a primeira isolada com maior frequência em animais de sangue frio, e a segunda comumente associada à gastroenterite em humanos e outros mamíferos (Fookes *et al.*, 2011). *Salmonella enterica* compreende cerca de 2500 sorovares tifoidais e não tifoidais, que são classificados de acordo com o perfil de lipopolissacarídeo (LPS) e flagelos. Entre os sorovares tifoidais, *S. Typhi* e *S. Paratyphi* são exclusivos de humanos, já entre os sorovares não tifoidais, destacam-se *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* como de interesse clínico (Larock *et al.*, 2015).

A salmonelose é uma doença de origem alimentar, de ocorrência estimada em dez milhões de casos em humanos por ano, resultando em centenas de óbitos. Os sinais e sintomas característicos são febre, dor abdominal, náusea e diarreia, com quadro autolimitante de 10 dias após o início dos sintomas (Who, 2013). Apesar de surtos da doença atraírem a atenção da mídia, cerca de 60 a 80% dos casos são classificados como esporádicos, não sendo considerados parte de um surto. Além disso, a maioria dos casos não são diagnosticados corretamente e a salmonelose é pouco notificada (Who, 2013).

*S. Typhimurium* é utilizada como modelo para estudo de interações com células hospedeiras, é resistente ao suco gástrico e possui a capacidade de invadir o epitélio intestinal, promovendo diarreia inflamatória. Suas habilidades de resistir a sais biliares e replicação intracelular concedem vantagens de crescimento no lúmen intestinal e evasão do sistema imunológico do hospedeiro, respectivamente (Larock *et al.*, 2015).

### 1.1. Patogenicidade em *Salmonella*

*Salmonella* possui diversos mecanismos para competir com a microbiota do hospedeiro e adquirir vantagens na colonização intestinal. Diferente das demais bactérias que habitam o intestino e que são possuidoras do sideróforo enteroquelina, *S. Typhimurium* utiliza o sideróforo salmoquelina para obtenção de ferro, evitando a atividade da lipocalina 2 (NGAL) e aumentando sua vantagem de crescimento (Raffatellu *et al.*, 2009). A enteroquelina é composta de um trímer cíclico de



dihidroxibenzoilserina, e a salmoquelina é um derivado glicosilado deste sideróforo (O'brien e Gibson, 1970; Bister *et al.*, 2004). A invasão epitelial feita por *Salmonella* acarreta na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no lúmen intestinal, e estes EROs reagem com o tiosulfato (produto da respiração da microbiota) gerando tetrionato. O tetrionato é utilizado por *Salmonella* – mas não pela microbiota – como um acceptor terminal de elétrons que auxilia durante crescimento anaeróbico ou microaerofílico (Winter *et al.*, 2010).

Durante a infecção promovida por *Salmonella* nota-se um processo patogênico complexo e marcado por uma variedade de fatores de virulência, o que colabora para que este seja um modelo importante de interação patógeno-hospedeiro. Entre os mecanismos utilizados para colonização do trato intestinal estão proteínas efetoras, que são inseridas na célula hospedeira gerando remodelamento do citoesqueleto, ativação de fatores inflamatórios e alteração da permeabilidade da membrana, resultando no quadro de diarreia observado em humanos (Haraga *et al.*, 2008). Algumas proteínas efetoras são codificadas em regiões do genoma de *Salmonella* conhecidas como “ilhas de patogenicidade”, que são caracterizadas por grandes regiões do DNA que conferem virulência e que estão ausentes em cepas de referência, como em *E. coli* K-12 quando comparada aos sorovares de *S. enterica*.

As ilhas de patogenicidade normalmente possuem um tamanho acima de 30 quilobases, estão inseridas em regiões móveis do DNA (adquiridas via transferência horizontal), associadas a transposases, integrases e possuem conteúdo GC atípico quando comparado ao restante do genoma bacteriano (Hacker e Kaper, 2002). Até o momento foram descritas 12 ilhas de patogenicidade, denominadas SPI (*Salmonella* Pathogenicity Island), sendo que algumas são conservadas no gênero *Salmonella* enquanto outras são específicas de alguns sorovares (Hensel, 2004). Apesar de algumas SPI ainda não terem sua função elucidada na virulência, SPI-1 e SPI-2 são as principais e são essenciais no processo patogênico. A primeira está ligada a invasão da célula hospedeira e a segunda é vinculada à replicação intracelular, sobrevivência em macrófagos e infecção sistêmica em camundongos (Galán e Curtiss, 1989; Ochman *et al.*, 1996; Cirillo *et al.*, 1998; Detweiler *et al.*, 2003).

SPI-1 e SPI-2 codificam distintos Sistemas de Secreção do Tipo 3 (do inglês, *Type Three Secretion System* – T3SS), estruturas em forma de agulha molecular, responsáveis por injetar proteínas efetoras essenciais durante os dois momentos do processo infeccioso (Shea *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2001). O locus SPI-1 contém

genes que codificam tanto efetores como reguladores do T3SS, entre eles estão três proteínas (SopE, SpoE2 e SopB) no lado do patógeno e outras três como as Rho GTPases (Rac1, Cdc42 e RhoG) no lado do hospedeiro. Estas proteínas efetoras são indispensáveis para um processo de invasão eficiente, pois juntas lideram a reorganização dos filamentos de actina no processo de internalização por macropinocitose (Friebel *et al.*, 2001). SopB e os demais efetores citados coordenam a secreção de cloreto via desfosforilação lipídica, estimulando indiretamente Cdc42 e RhoG através de sua atividade fosfoinositídeo fosfatase (Hardt *et al.*, 1998; Mcghee *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Patel e Galán, 2006). SopB também está relacionado à diarreia e doença intestinal por aumentar os níveis intracelulares de D-mio-inositol-1,4,5,6-tetraquis fosfonato, que estimula a secreção de cloreto (Friebel *et al.*, 2001).

SipA, outro efector que participa do processo de invasão embora não obrigatório, auxilia o início da polimerização no ponto específico de contato entre a célula bacteriana e a célula hospedeira (Higashide *et al.*, 2002).

Após sua formação, o fagossomo se funde aos lisossomos, e o ambiente do fagolisossomo se torna mais ácido e com espaço reduzido, dando origem ao *Salmonella Containing Vacuole* (SCV). É através do SCV que a bactéria utiliza a maquinaria do hospedeiro, se replica com auxílio dos efetores secretados pelo T3SS de SPI-2 e ao mesmo tempo evita resposta imune mediada por neutrófilos. SifA tem papel fundamental na indução da tubulação do fagossomo de *S. Typhimurium* e liga-se à proteína SKIP, uma quinase ligante encontrada em mamíferos. SifA, quando co-expressa com SseJ, induz a tubulação no hospedeiro mamífero, indicando que este efector mimetiza ou ativa GTPases da família RhoA (Nawabi *et al.*, 2008; Larock *et al.*, 2012). Assim, é clara a importância dos sistemas de secreção para a patogênese em *S. Typhimurium*.

## 1.2. Sinalização química

Procariotos e eucariotos empregam a comunicação célula-célula por meio de sinais químicos, de modo que essa sinalização pode ser intra e interespecífica, ou até mesmo inter e intra-Reinos (Sperandio *et al.*, 2003). A sinalização química entre os hormônios do hospedeiro Epinefrina (Epi) e Norepinefrina (Nor) e o Autoindutor 3 bacteriano foi inicialmente descrito para ativação de genes de virulência durante a

infecção por *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), e em seguida foi observado que esse mecanismo está presente em diversas espécies bacterianas e seus hospedeiros (Sperandio *et al.*, 2003). Estes sinais químicos são detectados por sistemas que agem como sensores do meio externo e regulam os mecanismos da célula em resposta ao estímulo, denominados sistema de dois componentes. Este sistema é composto de uma histidina quinase ligada à membrana bacteriana, e um regulador de resposta cuja função é detectar e promover uma resposta rápida a um estímulo ou estresse vindo do ambiente (Sperandio *et al.*, 2003).

Um dos sistemas de dois componentes previamente caracterizado e denominado QseBC foi reportado na participação da virulência em *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (Clarke *et al.*, 2006), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) (Sircili *et al.*, 2004), *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) (Hadjifrangiskou *et al.*, 2011), *S. Typhimurium* (Patel e Galán, 2006; Bearson e Bearson, 2008; Moreira *et al.*, 2010) além de outros sorovares, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Juárez-Rodríguez *et al.*, 2013), *Haemophilus influenzae* (Unal *et al.*, 2012), *Aeromonas hydrophila* (Khajanchi *et al.*, 2012), *Edwardsiella tarda*, *Francisella tularensis* (Mokrievich *et al.*, 2010), entre outros. Em um estudo feito com *E.coli* foi visto que QseBC promove a ativação da montagem do flagelo via T3SS, regulando sua virulência (Sperandio *et al.*, 2002).

Outro sistema de dois componentes sob regulação de Epi porém abaixo na cascata regulatória é o sistema QseEF, visto em EHEC e *S. Typhimurium* (Reading *et al.*, 2007; Moreira e Sperandio, 2012). Vale ressaltar que QseBC e QseEF interagem entre si, podendo ocorrer regulação cruzada (Moreira e Sperandio, 2012; Njoroge e Sperandio, 2012). O sensor quinase QseE sente Epi e níveis de íons sulfato e fosfato do ambiente, em seguida ocorre a fosfotransferência para seu cognato QseF que regula a ilha de patogenicidade LEE em EHEC (Njoroge e Sperandio, 2012), e SPI-1 em *S. Typhimurium* (Moreira e Sperandio, 2012) promovendo a virulência nestes patógenos. Mais estudos são necessários para elucidar outros sinais químicos que participam deste processo, levando em conta a diversidade da microbiota entre hospedeiros e conseqüentemente a riqueza e disponibilidade de nutrientes no lumen intestinal.

### 1.3. Estresse bacteriano

Bactérias tendem a encontrar diversos obstáculos durante o crescimento tanto no hospedeiro como em meio abiótico, desde falta de nutrientes e alterações no pH até choques térmicos e alta osmolaridade. Em resposta a essas situações adversas, elas desenvolveram mecanismos para sobrevivência e resposta ao estresse. Estes mecanismos podem ser específicos e gerar uma resposta rápida de reparo do dano (via sistemas de dois componentes), ou podem ser reguladores globais, promovendo proteção e auxiliando na manutenção da homeostase.

Em casos mais extremos, algumas bactérias formadoras de esporos como *Bacillus subtilis* conseguem passar por uma diferenciação celular em resposta à falta de nutrientes (Battesti *et al.*, 2011). Inicialmente descrito em *Escherichia coli*, a RNA polimerase subunidade S (RpoS), também denominada  $\sigma^S$  participa juntamente com o fator vegetativo RpoD ( $\sigma^{70}$ ) da resposta ao estresse global celular. Assim como outros fatores sigma, RpoS controla a expressão de cerca de 500 genes (Weber *et al.*, 2005) e atualmente verificou-se que o gene está bem conservado em Gammaproteobacteria. A regulação via RpoS ocorre em diferentes níveis: transcrição, tradução, degradação e regulação de atividade (Battesti *et al.*, 2011). Um dos maiores desafios durante crescimento em fase estacionária é o pH reduzido, e bactérias como *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella* são capazes de resistir ao pH 2.5. A resistência ao meio ácido é promovida por RpoS via *gadC* (relacionado a sobrevivência em baixo pH) e até mesmo via sistema PhoPQ – relacionado a resposta em baixos níveis de magnésio, peptídeos antimicrobianos e reconhecido por inibir a transcrição do operon de flagelo (Bougdoor *et al.*, 2008; Zhao e Houry, 2010; Park *et al.*, 2015). Foi vista também a participação de RpoS na sobrevivência de cepas persistentes de *E. coli* durante crescimento em solo (Somorin *et al.*, 2016), o que corrobora com alguns isolados de cepas patogênicas durante surtos infecciosos promovidos pelo consumo de alimentos. Em *S. enterica*, o promotor de *rpoS* é regulado negativamente por Fis, uma proteína ligadora de DNA normalmente abundante em fase exponencial de crescimento. Essa proteína atua no balanço homeostático das enzimas DNA girase e topoisomerase I, influenciando na topologia da dupla fita e relaxando o DNA. Fis também aparenta ter um papel importante na virulência durante a replicação e sobrevivência dentro de macrófagos, onde após o relaxamento da fita de DNA, verificou-se que o regulador contido em

SPI-2 *ssrA* encontrava-se regulado positivamente. O gene *ssrA* é necessário para sobrevivência de *Salmonella* dentro de macrófagos (Hirsch e Elliott, 2005; O Cróinín *et al.*, 2006). A Figura 1 ilustra os diversos níveis de regulação transcricional, traducional e proteolítica do regulador global *rpoS* na célula.

**Figura 1.** Diferentes níveis de regulação de *rpoS* sob diferentes condições de estresse

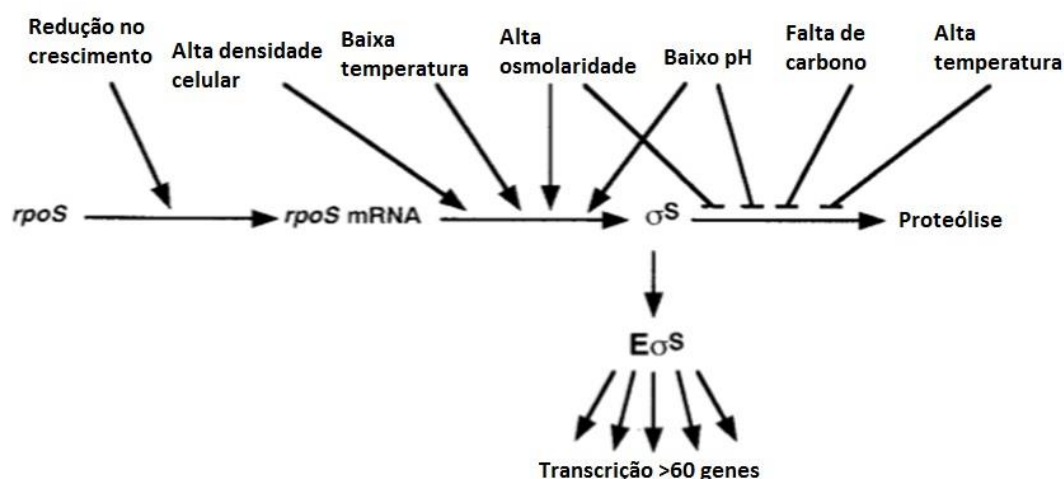


Figura 1. Vários níveis de regulação de *rpoS* são diferencialmente afetados por diversas condições de estresse na célula. (Hengge-Aronis, 2002) adaptado.

#### 1.4. VisP

Durante a caracterização da importância do sensor quinase QseC na patogênese de *S. Typhimurium* *in vivo* (Moreira *et al.*, 2010) foi identificada uma proteína periplasmática denominada VisP (*Virulence and Stress-related Periplasmic Protein*), a qual participa tanto nas funções celulares básicas e manutenção de membrana celular como também na sobrevivência e virulência (Moreira *et al.*, 2013).

Em um estudo proteômico comparativo da chaperona SecB em *E. coli* (Baars *et al.*, 2006), foi visto que VisP (anteriormente denominada YgiW) era SecB-dependente, além de responder ao estresse posteriormente em um estudo utilizando *E. coli* ambiental (Lee *et al.*, 2010). Em *S. Typhimurium* foi verificado que esta proteína responde a agentes antimicrobianos, como a Polimixina B (Merighi *et al.*, 2009).

VisP teve seu cristal resolvido (Moreira *et al.*, 2013) e foi classificada como uma proteína da família BOF (Oligonucleotide/oligosaccharide Binding Fold), a qual liga-se

a oligossacarídeos (Ginalski *et al.*, 2004). Além disso, sua estrutura sugere que a proteína é conservada também em *E. coli*, e os seis resíduos de aminoácidos da bolsa de ligação de BOF são compartilhados entre os dois organismos (Figura 2).

**Figura 2.** Estrutura da proteína VisP

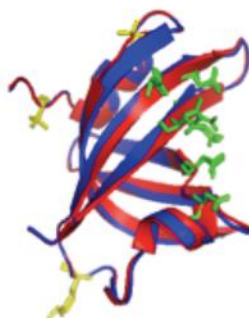


Figura 2. Sobreposição do modelo de VisP de *S. Typhimurium* (em azul) baseado na estrutura de *E. coli* (em vermelho). Modeller e MacPyMol software (Moreira *et al.*, 2013).

A localização genômica do gene *visP* revela que este faz parte do regulon de *qseBC*, em um operon adjacente e de direção oposta (Moreira *et al.*, 2013) como é ilustrado na Figura 3.

**Figura 3.** Organização dos operons de *visP/ygiV* e *qseBC*

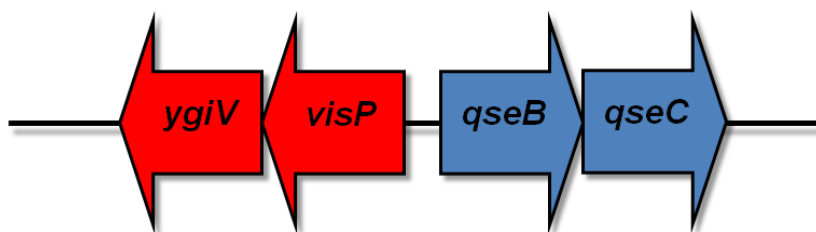


Figura 3. Organização dos operons *visP/ygiV* e *qseBC* em *S. Typhimurium* (Moreira *et al.*, 2013)

Devido a sua participação em funções celulares básicas como manutenção de membrana, metabolismo e resposta ao estresse, a proteína VisP também está conectada à via de sinalização química por Epi/Nor/Autoindutor-3 presentes em EHEC e *S. Typhimurium* via sistema QseBC (Sperandio *et al.*, 2003). Através de um estudo de análises transcriptômicas de um *oligoarray* realizado no mutante *qseC* em *S. Typhimurium* foi visto que *visP* estava 65 vezes aumentado comparativamente à

cepa selvagem, sendo o gene mais expresso da análise (Moreira *et al.*, 2013). Este resultado foi coerente a estudos anteriores feitos em EHEC e outro estudo semelhante em *S. Typhimurium* (Cirillo *et al.*, 1998).

Em ensaios fenotípicos realizados em macrófagos J774 o mutante de *visP* mostrou redução na replicação e proliferação (Moreira *et al.*, 2013), sendo que um dos mecanismos cruciais para o sucesso do processo patogênico de *S. Typhimurium* é a sobrevivência e replicação intracelular. Durante o estudo *in vivo* realizado em camundongos Balb/C foi constatado que o mutante de *visP* não era virulento em um modelo sistêmico de infecção, enquanto que os animais infectados com *S. Typhimurium* selvagem foram a óbito após dois dias a contar da infecção (Moreira *et al.*, 2013)

As proteínas pertencentes à família BOF ligam-se a oligossacarídeos, os quais são abundantes na camada de peptidoglicano. O peptidoglicano possui unidades repetidas de N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM). Durante o ensaio *in silico* realizado com VisP, verificou-se que a proteína liga-se a estes açúcares, especialmente ao NAM (Moreira *et al.*, 2013). Isso demonstrou a importância de VisP no periplasma da célula bacteriana, integrando os cuidados com a homeostase da membrana aos processos de virulência bacteriana e resposta ao estresse.

### 1.5. Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) é o componente mais externo do envelope celular em bactérias Gram-negativas, tornando-se o primeiro contato que a bactéria tem com a célula do hospedeiro. É constituído tipicamente pelo lipídeo A, também conhecido como uma endotoxina, uma porção intermediária oligossacarídica e o polissacarídeo distal (antígeno-O) (Raetz e Whitfield, 2002). O lipídeo A é reconhecido por células imunológicas de mamíferos como um Padrão Molecular Associado a Patógeno (PAMP), sendo detectado pelos receptores Toll-like 4 (TLR4) a níveis picomolares, o que promove ativação de macrófagos na síntese do Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ) (Raetz *et al.*, 2007). Devido a sua arquitetura semelhante em diversas bactérias Gram-negativas, alguns patógenos tendem a modificar as cadeias do lipídeo A com auxílio de diversas enzimas, a fim de evitar o sistema imunológico (Raetz e Whitfield, 2002). No entanto, quando a

inflamação é exacerbada em um quadro de sepse, algumas das proteínas produzidas em excesso podem causar danos aos vasos sanguíneos, promovendo um choque séptico. Neste quadro ocorre a liberação do lipídeo A e sua localização passa a ser sistêmica, visto que mesmo o lipídeo A sintético de *E. coli* provoca uma patologia similar quando injetado em animais (Rietschel *et al.*, 1994).

O antígeno-O está envolvido em resistência à fagocitose, peptídeos catiônicos e sistema complemento, e essas atividades estão relacionadas com o tamanho das cadeias polissacarídicas e sua distribuição ao longo da membrana (Hölzer *et al.*, 2009), dessa forma os organismos possuidores da forma longa do antígeno-O são mais resistentes à fagocitose do que aqueles que possuem apenas a forma curta (Delgado *et al.*, 2006). Em *S. Typhimurium* ocorre uma distribuição trimodal dessas cadeias ao longo da célula, inicialmente associadas aos genes *wzz*, onde *wzzST* está ligado à produção de cadeias longas e *wzzfepE* à produção de cadeias muito longas (Hölzer *et al.*, 2009). Durante um estudo da virulência de *S. Typhimurium* em cepas mutantes para *wzz* foi elaborado um modelo no qual o acesso do T3SS de SPI-1 à célula epitelial poderia estar prejudicado devido ao arranjo de cadeias muito longas e longas de antígeno-O, causando diminuição no processo de invasão. Em contraste, as cadeias longa e muito longa parecem não impedir a replicação intracelular em macrófagos, mediada por SPI-2 T3SS (Hölzer *et al.*, 2009). A Figura 4 ilustra distribuição das cadeias de antígeno-O em *S. Typhimurium* de acordo com cada um dos genes responsáveis pelo controle de seu comprimento.



**Figura 4.** Distribuição das cadeias de antígeno-O em *Salmonella* Typhimurium

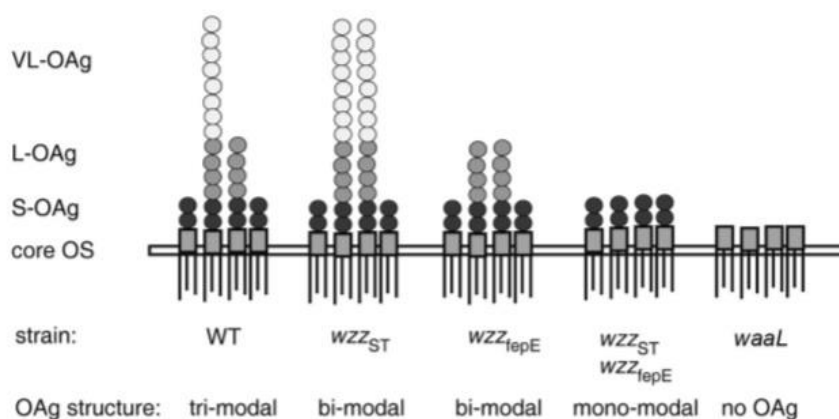


Figura 4. Distribuição das cadeias de antígeno-O de *S. Typhimurium* e os diferentes fenótipos observados na cepa selvagem e em mutantes isogênicos. A cepa WT possui a distribuição trimodal de cadeias curtas, longas e muito longas. O mutante de  $\Delta wzz_{ST}$ , gene responsável pela montagem de cadeias longas, apresenta distribuição bimodal (cadeias curtas e muito longas). O mutante de  $\Delta wzz_{lepE}$ , gene que codifica para montagem das cadeias muito longas, apresenta distribuição bimodal (cadeias curtas e longas). O duplo mutante  $\Delta wzz_{ST}/\Delta wzz_{lepE}$  apresenta distribuição monomodal (apenas cadeias curtas), e o mutante de  $\Delta waaL$  não possui antígeno-O (Hölzer *et al.*, 2009).

## 1.6. Quimiotaxia

O sistema quimiotático permite a detecção de compostos tóxicos e busca de nutrientes em um gradiente químico, ativando desta forma a motilidade bacteriana a fim de escapar de possíveis danos celulares ou ir em direção a novos nichos de colonização (Stock e Stock, 1987). Micro-organismos possuem grupos de quimiorreceptores que detectam sinais ambientais e os transmitem aos domínios localizados no citoplasma. As proteínas quimiotáticas MCPs são predominantes em bactérias e arqueias, e estão envolvidas em diversas atividades celulares como formação de biofilme, flagelo, degradação de compostos xenobióticos, formação de esporos, produção de exopolissacarídeos, associações simbióticas, entre outros (Salah Ud-Din e Roujeinikova, 2017). A quimiotaxia ocorre através de cinco

principais MCPs transmembrana para serina (Tsr), ribose e galactose (Trg), aspartato e maltose (Tar), dipeptídeos (Tap) e oxigênio (Aer). Em seguida o sinal segue para quimiorreceptores no periplasma e por fim atinge os domínios citoplasmáticos *che* de sinalização (Parkinson, 1993). Um receptor típico MCP consiste em um domínio ligante, hélices transmembranas e um domínio citoplasmático que interagem com as proteínas regulatórias da cascata de sinalização CheA, CheW, CheR e CheB. A proteína quinase CheA é capaz de fosforilar CheY, e os níveis de CheY fosforilado tende a regular a rotação do flagelo, movendo a célula para frente (Salah Ud-Din e Roujeinikova, 2017). A proteína CheZ é responsável pela regulação negativa dos níveis de CheY fosforilado, mais relacionada à pausa da rotação para posterior mudança de direção da célula (Stock e Stock, 1987). A ativação da motilidade promove rotação flagelar em meios líquidos, semi-sólidos e superfícies, e algumas bactérias podem promover um processo de diferenciação conforme o meio onde estão, tal como um aumento no número de flagelos ou um aumento no comprimento celular (Harshey, 2003). A maioria dos genomas bacterianos sequenciados inclui homólogos de genes que codificam componentes flagelares e vias quimiotáticas, o que indica que a motilidade é amplamente disseminada e promove uma vantagem seletiva, especialmente em ambientes não homogêneos ou limitantes em nutrientes (Wadhams e Armitage, 2004). A Figura 5 ilustra os sistemas de dois componentes que participam do processo de quimiotaxia na célula bacteriana.

**Figura 5.** Sistemas de dois componentes de quimiotaxia

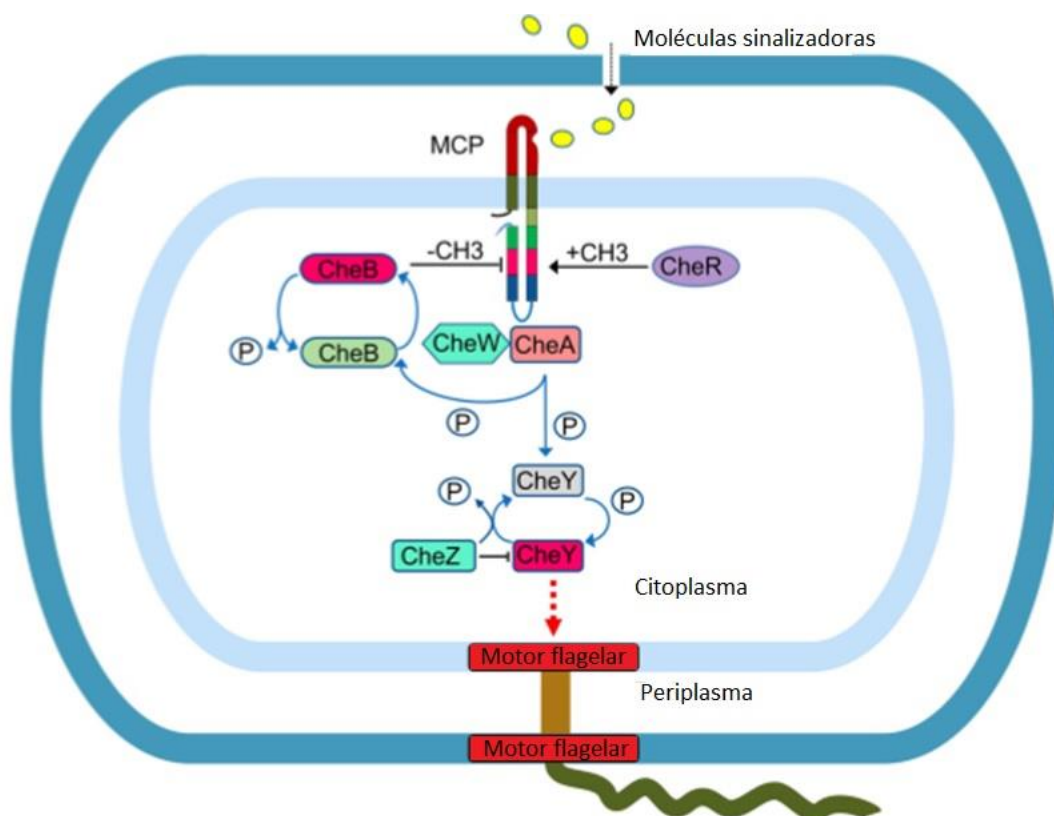


Figura 5. Representação da célula bacteriana e seus sistemas de dois componentes envolvidos no processo de quimiotaxia. (Salah Ud-Din e Roujeinikova, 2017), adaptado.

### 1.7. Motilidade

Bactérias se movimentam ao longo de superfícies na busca de nutrientes, novos nichos de colonização, fuga de compostos tóxicos e até mesmo na formação de estruturas complexas como o biofilme. A motilidade pode ser classificada em: dependente de flagelos e Força Prótica Motriz – PMF (*swimming* e *swarming*), dependente de pili tipo IV (*twitching*), dependente de complexos focais de adesão ao longo do eixo celular (*gliding*) e dependente do crescimento bacteriano utilizando um surfactante como facilitador (*sliding*) (Park *et al.*, 2015).

Em *Myxococcus xanthus* foi observada motilidade do tipo *twitching*, onde o pili tipo IV é montado em um dos polos da célula, e o movimento é produzido conforme o pili se liga a exopolissacarídeos e em seguida se retrai, locomovendo a célula (Mignot *et al.*, 2007). O *twitching* foi observado também em *Neisseria gonorrhoeae*, diplococo Gram-negativo de grande importância clínica, onde o pili tipo IV auxilia na

colonização de tecidos além de possuir mecanismos de conversão antigênica e variação de fase para escapar do sistema imunológico do hospedeiro (Zaburdaev *et al.*, 2014).

O *gliding* foi observado durante um estudo em *Mycoplasma mobile*, no qual foi visto que uma proteína denominada Gli521 mostrou ser essencial para geração e transmissão da força para a execução do movimento celular (Seto *et al.*, 2005). Em *Flavobacterium johnsoniae*, foi descrita uma proteína efetora com papel de adesina, SprB, secretada via Sistema de Secreção do tipo 9 e de papel essencial para a movimentação do tipo *gliding* do gênero *Flavobacterium* (Shrivastava *et al.*, 2016).

Recentemente, um estudo verificou a existência de motilidade independente de flagelos em *S. Typhimurium*, sugerindo que o patógeno utiliza-se também de *sliding* para se movimentar em gradientes de magnésio (Park *et al.*, 2015), o que reacendeu a discussão a respeito de motilidade e organelas participantes. Baixas concentrações de magnésio ativam o sistema de dois componentes PhoPQ, levando à produção da proteína PagM, e assim gerando um fenótipo de *sliding*, uma vez que o regulador de resposta PhoP reprime a expressão do flagelo (Park *et al.*, 2015).

Uma forma distinta de motilidade é observada em *Leptospira* spp.: as espiroquetas possuem flagelos periplasmáticos (PF), os quais são semelhantes aos flagelos externos em estrutura e função, consistindo de um complexo basal ou motor, um gancho e um filamento flexível. O PF mostrou ser indispensável na virulência da bactéria, visto que os mutantes perderam sua capacidade de causar doença em hamsters modelos para leptospirose (Wunder *et al.*, 2016).

O flagelo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é idêntico, com exceção de que em Gram-negativas ele se estende à membrana externa. Em Arqueias o mecanismo de montagem flagelar é diferenciado e ocorrem diversas modificações pós-traducionais nas unidades de flagelina (Bardy *et al.*, 2004). A motilidade tipo *swimming* e *swarming* ocorre via flagelos, sendo que a primeira está relacionada à movimentação individual feita em meios líquidos e superfícies semi-sólidas (0,1 a 0,3% de ágar) e a segunda é uma movimentação de um grupo de células que passam por diferenciação (*swarmer cells*), em superfícies sólidas (0,4 a 1% de ágar) e necessitam de uma fonte rica de carbono (Park *et al.*, 2015).

O *swimming* normalmente ocorre quando a bactéria, guiada por quimiotaxia, se locomove no meio em busca de nutrientes, locais de colonização e fuga de componentes tóxicos (Harshey e Partridge, 2015). Já o *swarming* parece reprimir os

genes de quimiotaxia e usar a dinâmica do movimento em grupos a fim de continuar a aquisição de novos territórios. Para realização do *swarming*, é necessária a presença de um ou mais flagelos, síntese de compostos surfactantes e movimentação agrupada (Kearns, 2010). É comum em bactérias que possuem um ou mais flagelos polares a montagem de flagelos laterais durante o processo de diferenciação para o *swarming*. *Vibrio parahaemolyticus*, *Rhodospirillum centenum* e *Aeromonas* spp. são capazes de induzir a produção destes flagelos (Kearns, 2010).

Muitas vezes, bactérias que realizam *swarming* em laboratório nem sempre apresentam este fenótipo na natureza, e a capacidade de realizar *swarming* pode variar de acordo com a quantidade de água presente na superfície. Bactérias como *Proteus mirabilis* e *Vibrio parahaemolyticus* conseguem utilizar o *swarming* em superfícies contendo 1,5% de ágar ou mais sendo chamadas de *robust swimmers*, enquanto que *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Yersinia* e *Serratia* preferem superfícies de 0,4 a 0,8% de ágar, denominadas *temperate swimmers* (Partridge e Harshey, 2013a). Além disso, é importante destacar que nem sempre o fenótipo de diferenciação celular aparece: foi constatado que *S. Typhimurium* promove alongamento da célula, porém, não aumenta o número de flagelos, ao invés disso parece melhorar o torque e estabilidade dos flagelos já em atividade (Partridge e Harshey, 2013a).

### **1.8. Flagelos em *Salmonella***

Os flagelos em *Salmonella* são peritríquios, e sua montagem é regulada por uma complexa cascata coordenada de genes, possuindo duas fases de funcionamento distintas, a fim de ancorar-se à parede celular bacteriana culminando em movimentação (Chevance e Hughes, 2008). Mais de 60 proteínas estão envolvidas na estrutura e funcionamento flagelar, as quais são produzidas por genes iniciais, intermediários e tardios, também chamados classe 1, 2 e 3 respectivamente (Osterman *et al.*, 2015). O flagelo é composto principalmente por um motor, um propulsor e uma junta universal que conecta as duas partes. O corpo basal é a estrutura mais complexa do flagelo e é composto de quatro anéis: o anel C (localizado no citoplasma), o anel MS (localizado na membrana interna), o anel P (mergulhado no periplasma) e o anel L (localizado na membrana externa). O T3SS de flagelo parece iniciar sua montagem a partir do centro do anel MS, em seguida

montando a haste, o gancho e o filamento, enquanto que os anéis P e L são dependentes da secreção da proteína Sec (Chevance e Hughes, 2008). A Figura 6 ilustra o flagelo e as proteínas que o compõem.

**Figura 6.** Esquema representativo do flagelo em *Salmonella* e suas estruturas

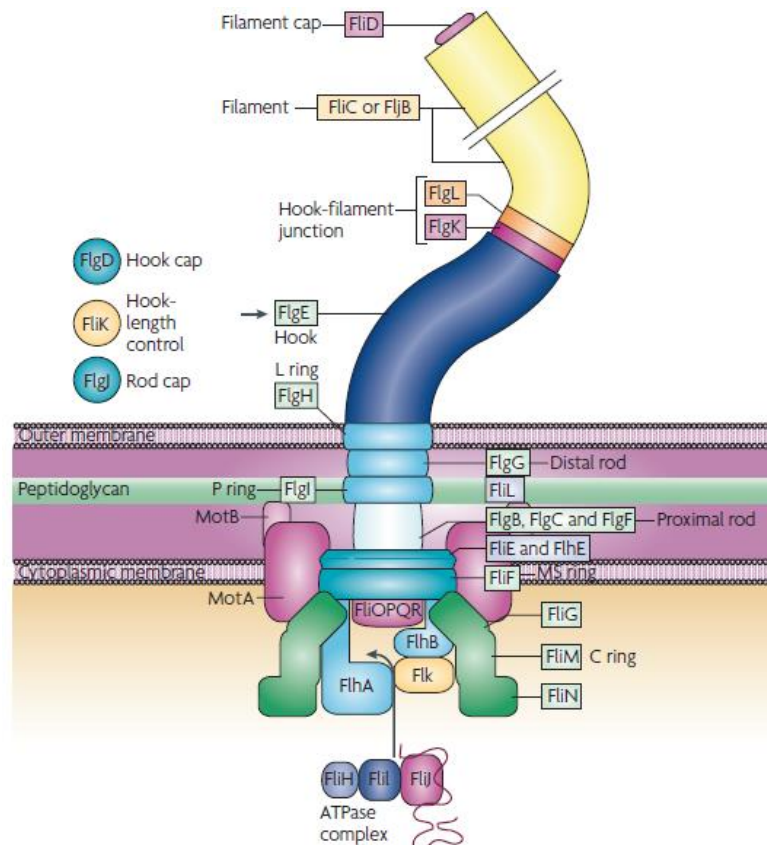


Figura 6. Ilustração do flagelo e suas macroestruturas proteicas (Chevance e Hughes, 2008)

A geração de torque que culmina na movimentação flagelar é originada no anel C, que é ligado ao rotor e também é chamado de complexo comutador, e o rotor é movido por meio da PMF. Diversas proteínas estatoras interagem com o motor flagelar e promovem estabilidade, entre elas estão MotA e MotB, FliG, FliM e FliN (Figura 3). O motor está localizado na haste proximal (FlgB, FlgC e FlgF) seguido do anel P e da haste distal. A rotação flagelar ocorre nos sentidos anti-horário e horário, e o sistema quimiotático interage com a proteína FliM a fim de alternar a direção da rotação.

Após o anel L (membrana externa) ocorre a montagem do gancho flagelar, composto de 120 cópias de FlgE. O gancho é importante pois auxilia na formação de flagelos a partir de diferentes pontos da célula (peritríquios), mantendo a

movimentação coordenada para mover a célula adiante (Chevance e Hughes, 2008). Em seguida, após o gancho estão duas proteínas que formam a junção deste com a próxima estrutura: o filamento. Em *Salmonella*, o filamento é longo e composto de duas flagelinas (FliC e FliB) que podem alternar ao longo da estrutura, cerca de 20 mil subunidades formam a porção mais flexível do propulsor. FliC e FliB são idênticas em 71 aminoácidos de início e 46 aminoácidos finais, sendo FliC a flagelina principal e FliB é transcrita através do operon *fljBA*. Este operon depende de uma DNA invertase, e FliA atua como um regulador negativo de *fliC* em níveis transcricionais e traducionais, caracterizando a variação de fase do flagelo (Bonifield e Hughes, 2003). A flagelina é reconhecida rapidamente pelo sistema imunológico (mais especificamente pelos receptores Toll-like 5 TLR5) por ser um PAMP, por isso acredita-se que a variação de fases entre essas suas proteínas seja uma forma de evasão do sistema imune (Bonifield e Hughes, 2003).

A montagem flagelar envolve 26 operons e 68 genes, divididos em classes 1, 2 e 3. O operon mestre *flhDC* (classe 1) está sob regulação de inúmeros reguladores globais, e sua indução produz um complexo heteromultimérico FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, que ativa o fator de transcrição  $\sigma^{70}$  gerando autorepressão do gene *flhDC* e promovendo a transcrição dos promotores de classe 2. Os genes de classe 2 são transcritos e dão origem ao corpo basal e gancho flagelar. Após a completa polimerização do gancho, o fator de transcrição  $\sigma^{28}$  alterna a secreção do substrato, e os genes de classe 3 são transcritos para compor o filamento (Aldridge e Hughes, 2002; Chevance e Hughes, 2008; Altegoer e Bange, 2015). É importante que a montagem flagelar siga um tempo correto e a secreção dos substratos ocorra de acordo com a transcrição de cada classe de genes, mantendo o padrão sincronizado da montagem de diferentes flagelos ao mesmo tempo. A Figura 7 ilustra a regulação gênica e a montagem do flagelo.

**Figura 7.** Esquema da regulação gênica flagelar e montagem do flagelo

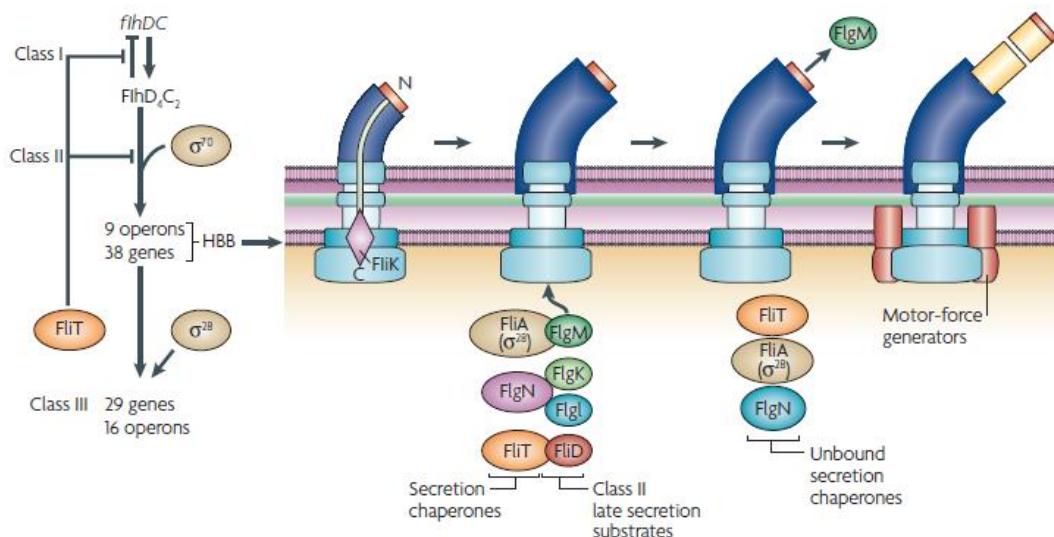


Figura 7. Montagem flagelar de acordo com a transcrição dos genes de classes 1, 2 e 3 (Chevance e Hughes, 2008)

Os flagelos são produzidos por *Salmonella* durante a infecção e são necessários para movimentação no lumen intestinal, na busca de novos nichos e também possuem papel de adesão e formação do biofilme. Além da variação de fases entre as flagelinas polimerizadas no filamento, foi constatado que a glicosilação é relativamente comum e extremamente versátil em membros da família Enterobacteriaceae (De Maayer e Cowan, 2016). Foram identificadas ilhas de glicosilação de flagelina nos genomas de diversas espécies bacterianas, e estes *loci* codificam diversas estruturas de açúcares, substituídos por grupos formil, metil, acetil, lipoil e aminos, demonstrando que a prevalência e versatilidade das modificações transcricionais e pós-traducionais de flagelina têm um papel biológico importante para as enterobactérias, tanto em imunomodulação, proteção contra degradação proteolítica e virulência (De Maayer e Cowan, 2016).



## 2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi investigar a motilidade mediada por flagelos e seu funcionamento em *S. Typhimurium*, bem como a participação de VisP durante o processo.

Objetivos específicos:

- I. Pesquisar a motilidade mediada via flagelos no mutante isogênico  $\Delta visP$  e, e caracterizar os mecanismos envolvidos e sua importância na patogenicidade de *Salmonella Typhimurium*.
- II. Investigar o papel de VisP e mecanismos correlatos durante a motilidade mediada via flagelos.

## 3. Material e métodos

### 3.1. Delineamento experimental

O trabalho buscou identificar diferenças fenotípicas de flagelo, tais como:

- Expressão do flagelo em condições normais e de estresse;
- Observação de diferenças no LPS e suas implicações no flagelo.

Detalhes das diferenças em flagelo:

- Expressão gênica de genes correlatos;
- Diferenciação da flagelina em extratos proteicos distintos;
- Caracterização microscópica flagelar afetando outros aspectos do crescimento bacteriano.

#### 3.1.1. Cultivo e armazenamento de bactérias

O estoque bacteriano para utilização nos experimentos deste projeto foi obtido através da coleção geral de bactérias do laboratório. As cepas conservadas em tubos criogênicos foram estriadas em placas contendo meio de cultura Luria Bertani (LB) e ágar, e cultivadas por 18 horas a 37° C. As colônias isoladas após o cultivo foram transferidas para tubos contendo 3mL de meio líquido LB com adição de antimicrobianos específicos para seleção de cepas com marca de resistência. Após crescimento por 18 horas sob agitação a 37° C, coletou-se 0,5mL da cultura e transferiu-se para um tubo criogênico contendo 0,5mL de LB glicerol 50%. Todas as

cepas foram estocadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}$  C. O Quadro 1 reúne as cepas cultivadas e utilizadas ao longo deste estudo.

**Quadro 1.** Cepas bacterianas utilizadas neste estudo

Descrição da cepa	Marca de resistência	Origem
<i>Salmonella</i> Typhimurium SL1344	Estreptomicina, Canamicina	(Hoiseth e Stocker, 1981)
SL1344 mutante $\Delta visP$	Estreptomicina	(Moreira <i>et al.</i> , 2013)
SL1344 mutante $\Delta visP$ complementado com pBADMycHisA ( <i>visP+</i> )	Ampicilina	(Moreira <i>et al.</i> , 2013)
SL1344, mutante $\Delta wzz_{fepE}$	Estreptomicina	Coleção PASIQUIBAC
SL1344, mutante $\Delta wzz_{ST}$	Estreptomicina	Coleção PASIQUIBAC
SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz_{fepE}$	Cloranfenicol	Coleção PASIQUIBAC
SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$	Cloranfenicol	Coleção PASIQUIBAC
SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz(fepE)$ com pBADMycHisA ( <i>visP+</i> )	Ampicilina	(Da Silva, 2016)
SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz(ST)$ com pBADMycHisA ( <i>visP+</i> )	Ampicilina	(Da Silva, 2016)

Quadro 1. Relação de cepas utilizadas neste estudo e suas respectivas marcas de resistência.

### 3.1.2. Ensaios de motilidade

Para avaliar o fenótipo de *swimming* das cepas, foram inoculados em quintuplicata 5 $\mu$ L de um cultivo de 18 horas feito em caldo LB no centro de uma placa contendo LB ágar na concentração de 0,3% (semissólido), inserindo o cultivo dentro do meio de cultura. Foram testadas concentrações de 1% e 2% de cloreto de sódio. Após 8 horas de incubação em estufa a 37 °C foi medido o diâmetro do halo de crescimento (Sperandio *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2010).

Para avaliar o fenótipo de *swarming*, foram inoculados em quintuplicata 5 $\mu$ L de um cultivo de 18 horas feito em caldo LB na superfície de uma placa contendo LB na concentração de 0,5% de ágar. Para este ensaio foram utilizadas as concentrações convencional e aumentada de cloreto de sódio (1% e 2% de NaCl, respectivamente). As leituras do diâmetro dos halos de crescimento foram feitas 8, 24 e 48 horas após o inóculo em estufa 37 °C (Harshey e Matsuyama, 1994).

### 3.1.3. Extração de RNA

A técnica de extração de RNA emprega solução desnaturante forte, sendo o TRIzol® (Ambion) a mais utilizada (fenol e isotiocianato de guanidina) e que foi escolhida, de forma a romper a célula e inativar a enzima RNase além de dissolver os componentes celulares. Em seguida utilizou-se clorofórmio para separação de fases: a fase aquosa contém RNA, a fase intermediária contém DNA e a fase orgânica possui proteínas, membrana e demais organelas. A solução aquosa foi escolhida e à ela foi adicionado etanol 100% para solubilizar as moléculas de RNA. Através de um sistema usando uma coluna de separação, o RNA foi eluído e tratado com DNase para remover vestígios de DNA e aumentar a pureza do produto final. Dessa forma, foi utilizado o *RiboPure Bacteria RNA Isolation kit* da Ambion-Life, de acordo com as instruções do fabricante. As extrações foram feitas em caldo LB nas concentrações de 1 e 2% de cloreto de sódio, e obtidas na DO<sub>600</sub> de 1,0 a 37°C sob agitação.

### 3.1.4. Análise de expressão gênica via qRT-PCR

A técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi empregada conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006), dessa forma foram realizados três ensaios independentes. Cada reação de 20uL continha o *Master Mix SYBR®*, a *Multi-scribe® Reverse Transcriptase* e o RNase *inhibitor* (Thermo Fisher Scientific), além de 100ng de RNA da cepa. A normalização foi feita via *rpoA* (RNA polimerase subunidade A) como gene de referência. Foi utilizado o QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific) para realização do qRT-PCR, e os resultados obtidos foram analisados pelo método de *Comparative critical threshold* ( $\Delta\Delta Ct$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).

### 3.1.5. Extração de proteínas totais e quantificação proteica

Para extração proteica (Moreira *et al.*, 2013) foi feito um cultivo das cepas em 25mL de LB por 18 horas em estufa a 37 °C, que em seguida foi centrifugado a 4200 x g por 6 minutos, dessa forma o meio de cultura (sobrenadante) foi descartado. Em seguida o *pellet* foi ressuspenso em 10mL de PBS 1x estéril e a este volume foi adicionado 100uL do inibidor de protease PMSF a 100mM. As cepas foram mantidas

em gelo e transferidas para um tubo plástico de 15mL. Para o rompimento celular, foi utilizado sonicador Q125 da marca QSonica, com ponteira 1/8" previamente higienizada. As células foram sonicadas na amplitude de 40%, 10 pulsos e com intervalo de 10 segundos entre eles, durante 4 minutos, totalizando 8 minutos de duração. Os tubos permaneceram no gelo durante todo o procedimento, e após o sonicação se apresentar límpido, foi feita centrifugação a 4200 x g por 10 minutos (refrigerado). O sobrenadante então foi separado do *pellet* e ambos foram armazenados a -20 °C.

A quantificação foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976), no qual a curva padrão foi preparada a partir de uma solução de BSA a 2mg/mL (Bio Rad), e em seguida foram feitas as diluições seriadas para obtenção das demais concentrações. A quantificação foi realizada a partir das cepas do extrato de proteínas no espectrofotômetro BioMate 3S (Thermo Fisher Scientific) e a leitura foi feita em comprimento de onda de 595nm. O Quadro 2 a seguir mostra as quantidades de proteínas totais obtidas em cada uma das cepas.

**Quadro 2.** Quantificação de proteínas totais

Linhagens bacterianas isogênicas	Concentração (mg/mL)
<i>WT</i>	0,215
$\Delta visP$	0,153
$\Delta visP/visP+$	0,216
$\Delta wzzfepE$	0,139
$\Delta wzzST$	0,164
$\Delta visP/\Delta wzzfepE$	0,204
$\Delta visP/\Delta wzzST$	0,237
$\Delta visP/\Delta wzzfepE/visP+$	0,160
$\Delta visP/\Delta wzzST/visP+$	0,169

Quadro 2. Quantificação de proteínas totais obtidas pelo método de Bradford

### 3.1.6. SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é o método mais utilizado para análises qualitativas de proteínas, além

de ser particularmente útil para acompanhar a purificação de proteínas. Sendo um método em que proteínas são separadas segundo o tamanho, a análise de proteínas por SDS-PAGE também é útil para a determinação da massa molecular relativa da proteína (Wilson e Walker, 2010). As proteínas do extrato total proteico foram retiradas do freezer e mantidas em gelo, e após descongelamento foram adicionadas três partes da cepa e uma parte do tampão Laemmli Buffer 4x contendo 2-mercaptoetanol, em microtubo de 1,5mL. Em seguida as cepas foram incubadas em banho-maria a 95 °C por 5 minutos, e após o tempo decorrido foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%. Para o lisado bacteriano, as cepas foram centrifugadas para retirada do excesso de meio de cultura, fervidas em banho-maria e aplicadas no gel como descrito anteriormente. A corrida do gel foi feita no *MiniProtean Tetra System* da marca BioRad, inicialmente com 120 volts (primeiros 20 minutos) e posteriormente 140 volts, por cerca de 1h20min. Para visualização das bandas foi utilizada coloração por Coomassie G-250.

### **3.1.7. Western blot**

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose foi feita utilizando o método semi-seco (Sambrook *et al.*, 1989), no *Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell* da marca BioRad, com os papéis de filtro e membranas previamente hidratadas em tampão próprio para transferência. Foram posicionados dois papéis de filtro, seguidos da membrana, do gel e por último mais dois papéis de filtro. A transferência foi feita a uma voltagem de 25 volts por 30 minutos seguida de 15 volts por mais 30 minutos. Logo após a transferência, a membrana foi bloqueada por no mínimo 3 horas em solução contendo leite em pó desnatado a 0,4%.

### **3.1.8. Immunoblot**

Após bloqueio da membrana, foi feita incubação com anticorpo primário anti-FliC ou anti-RpoA, nas proporções de 1:1000 e 1:5000 respectivamente, diluído em tampão PBS Tween 0,5% (PBST) durante 2 horas sob agitação. Em seguida lavou-se a membrana três vezes com PBST e intervalo de 10 minutos sob agitação. Após a lavagem foi adicionado anticorpo secundário anti-IgG HRP na proporção de

1:2500, também diluído em PBST, com incubação de 1 hora sob agitação. Logo após foi feita lavagem da membrana três vezes com PBST, e por último foi adicionado o *ECL Western Blotting* (Promega) para revelar a quimioluminescência. As imagens foram detectadas utilizando *ChemiDoc MP Imaging System* da BioRad (Sambrook *et al.*, 1989).

### **3.1.9. Microscopia**

Foi empregada a técnica de microscopia óptica através de um cultivo de cepa em 2mL de caldo LB por um período de 4 horas em estufa a 37°C. Em seguida foram aplicados 20µL de cada cepa em lâmina e cobertos com lamínula, seguindo para análise imediata. Foram avaliados na objetiva de 1000x de aumento os parâmetros de motilidade como a rapidez do movimento, a capacidade de alternar a trajetória, quantidade de células imóveis por campo e número de bacilos longos por campo, em um total de 10 campos por cepa.

### **3.1.10. Análise estatística**

Os dados obtidos a partir dos ensaios foram normalizados a partir da cepa controle (*S. Typhimurium* SL1344 tipo selvagem) e a significância estatística foi obtida por meio do teste *t* de Student, sendo que os valores de  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  foram considerados altamente significantes.

## **4. Resultados**

### **4.1. Ensaio de motilidade**

Para a visualização das diferenças fenotípicas de flagelo em condições convencionais e de estresse, foram realizados ensaios de motilidade dos tipos *swimming* e *swarming* com as cepas anteriormente descritas em métodos. A Figura 8 ilustra o ensaio tipo *swimming* feito com as cepa SL1344 (*S. Typhimurium*) tipo selvagem e seus mutantes isogênicos. A medida dos halos foi feita após 8 horas de incubação a 37 °C.

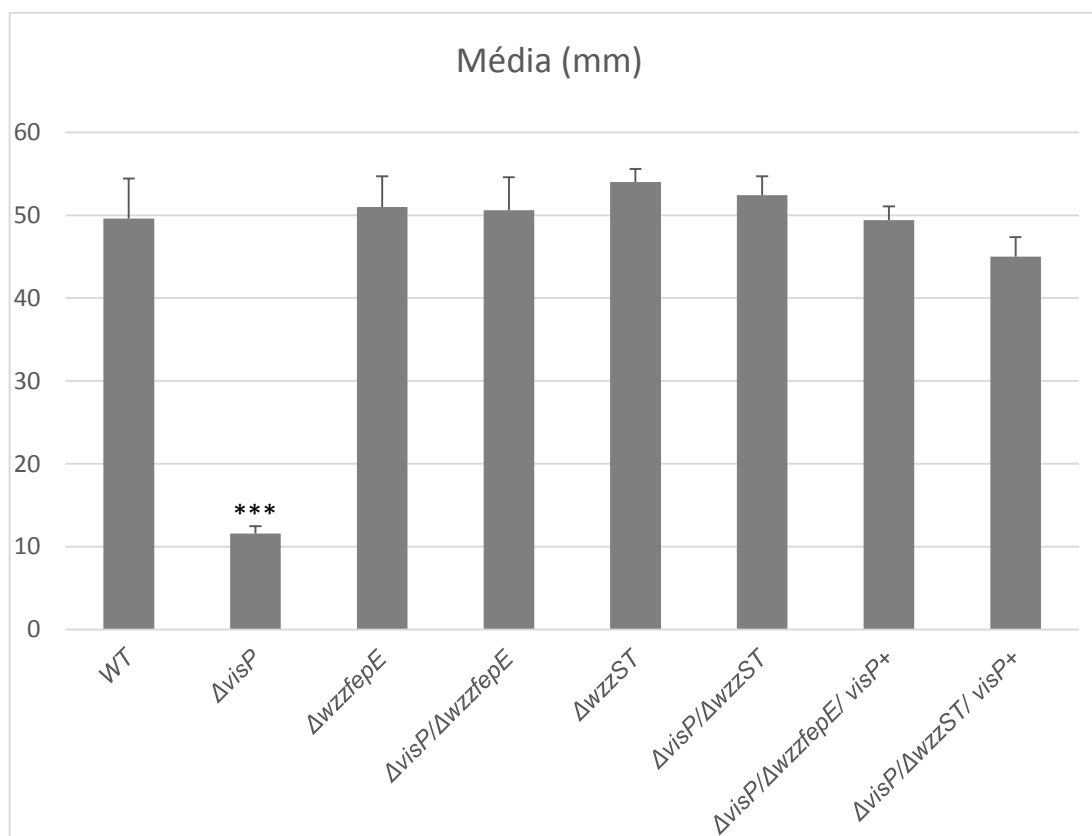
**Figura 8.** Ensaio do tipo *swimming* em LB 1% NaCl

Figura 8. Medida dos halos de crescimento feita após 8 horas de incubação a 37 °C, em LB ágar 0,3% contendo 1% de cloreto de sódio.  $P < 0,001$  (\*\*\*)

O mutante  $\Delta visP$  apresentou grande redução na motilidade de 77% comparativamente à cepa selvagem (WT), com valor de  $P < 0,001$  considerado extremamente significativo. Os demais mutantes e duplos mutantes não apresentaram diferença estatística significativa no fenótipo comparado à WT. Em seguida foi feito *swimming* utilizando concentração de 2% de cloreto de sódio. A Figura 9 ilustra o ensaio de *swimming* feito com LB e 2% de cloreto de sódio com a cepa selvagem e seus respectivos mutantes.

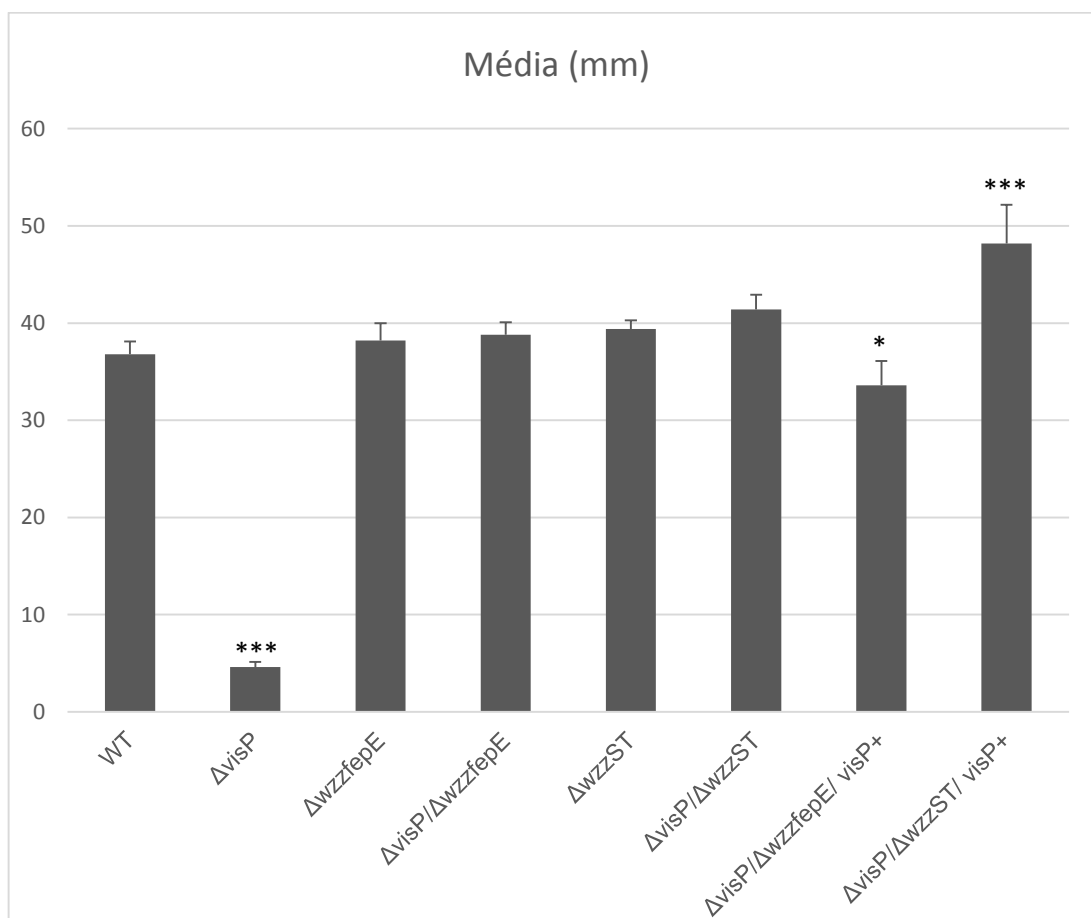
**Figura 9.** Ensaio do tipo *swimming* em LB 2% NaCl

Figura 9. Medida dos halos de crescimento feita após 8 horas de incubação a 37 °C, em LB ágar 0,3% contendo 2% de cloreto de sódio.  $P < 0,001$  (\*\*\*),  $P < 0,05$  (\*).

Novamente o mutante  $\Delta visP$  apresentou redução significativa na motilidade comparativamente à selvagem – cerca de 88%. Os mutantes  $\Delta wzzfepE$ ,  $\Delta wzzST$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST$  apresentaram fenótipo semelhante ao observado no ensaio anterior, enquanto que  $\Delta visP/\Delta wzzfepE/visP+$  apresentou redução de 8,7% e  $\Delta visP/\Delta wzzST/visP+$  mostrou um aumento de 30,9% no perfil de motilidade comparado à selvagem. Para o ensaio de *swarming* foram também testadas as concentrações de 1% e 2% de NaCl. A medida dos halos de crescimento foram feitas após 12, 24 e 48 horas de incubação a 37 °C. A Figura 10 ilustra o ensaio de *swarming* feito a 1% de NaCl.



**Figura 10.** Ensaio do tipo *swarming* em LB 1% NaCl

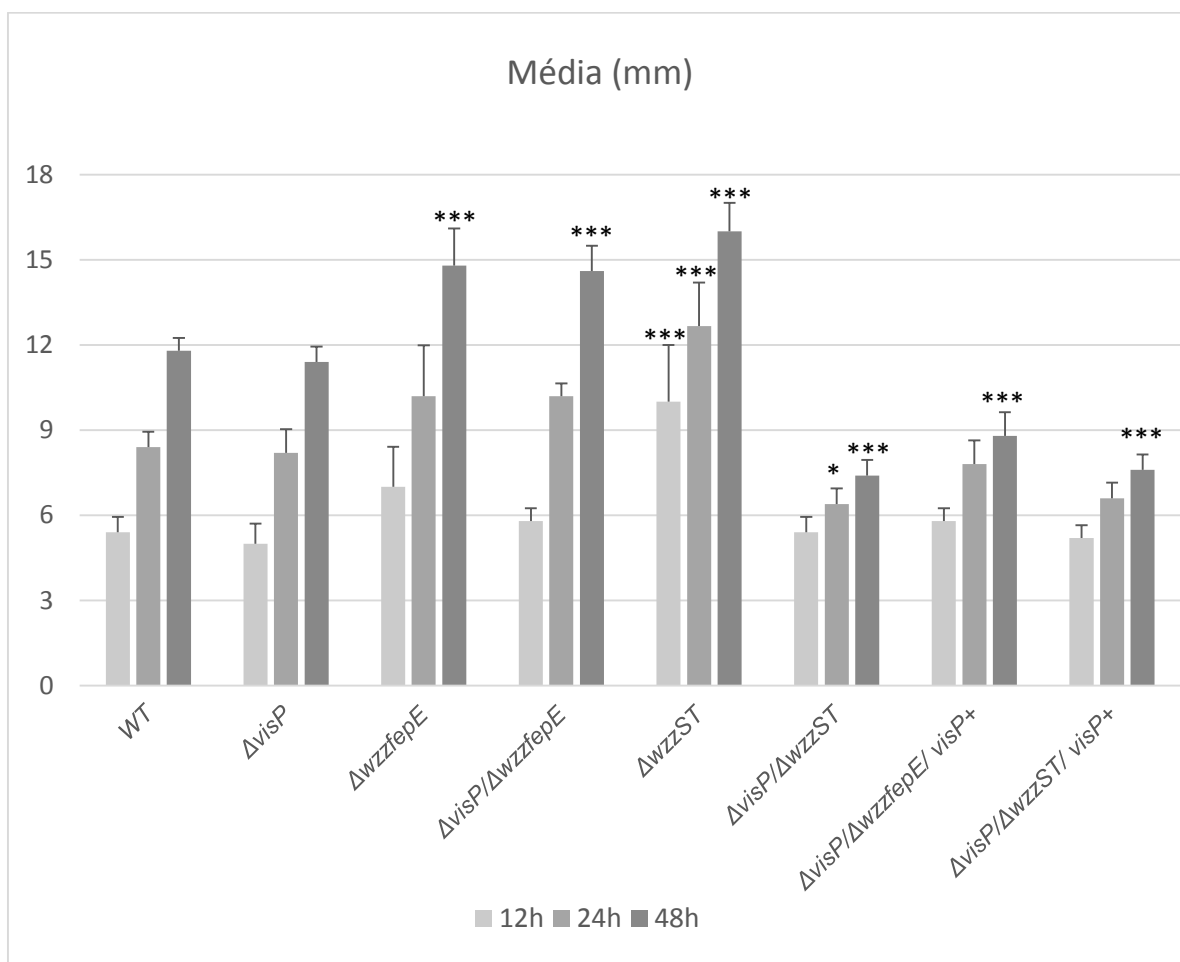


Figura 10. Medida dos halos de crescimento feita após 12, 24 e 48 horas de incubação a 37 °C, em LB ágar 0,5%.  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,001$  (\*\*\*)

No ensaio de *swarming* feito a 1% de NaCl (Figura 7), o mutante  $\Delta visP$  apresentou redução de 3% na motilidade comparada à WT ao final de 48 horas, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os mutantes  $\Delta visP/\Delta wzzST$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE/visP+$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST/visP+$  também apresentaram fenótipo reduzido: 37%, 25% e 35% menor, respectivamente. O mutante  $\Delta wzzfepE$  apresentou aumento de 25% na motilidade, o duplo mutante  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$  apresentou 23% a mais de motilidade comparada à WT e o mutante  $\Delta wzzST$  apresentou fenótipo aumentado em 36% ao final das 48 horas de ensaio. A Figura 11 ilustra o ensaio de *swarming* feito em concentração de 2% de NaCl.

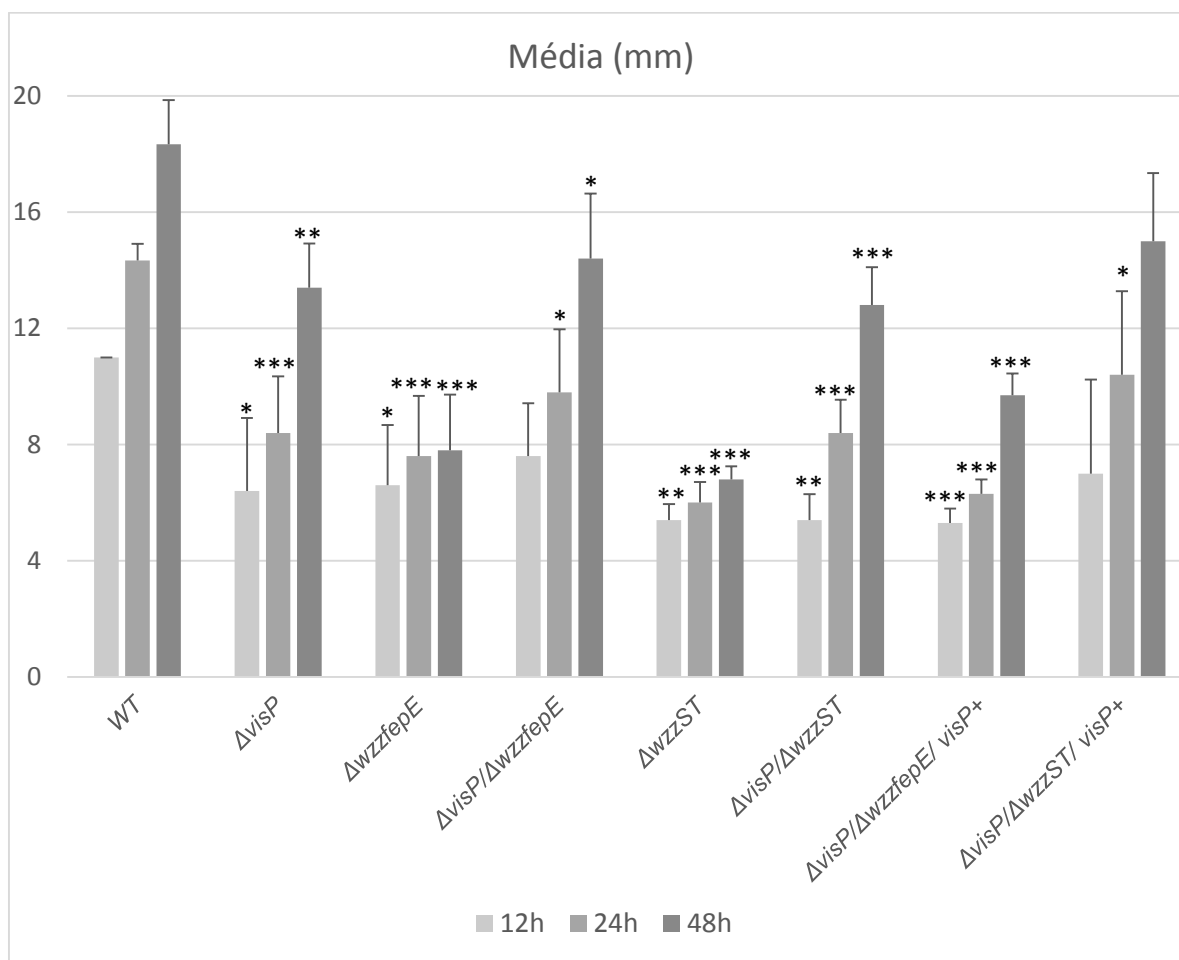
**Figura 11.** Ensaio do tipo *swarming* em LB 2% de NaCl

Figura 11. Medida dos halos de crescimento feita após 12, 24 e 48 horas de incubação a 37 °C, em LB ágar 0,5%. P<0,05 (\*), P<0,01 (\*\*), P<0,001 (\*\*\*).

No ensaio de *swarming* feito a 2% de NaCl (Figura 8), o mutante  $\Delta visP$  apresentou redução de 27% na motilidade comparativamente à WT ao final de 48 horas, o mutante  $\Delta wzzfepE$  apresentou redução e 57% e o duplo  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$  apresentou motilidade 21% menor. Já o mutante  $\Delta wzzST$  apresentou redução de 63% e o duplo  $\Delta visP/\Delta wzzST$  apresentou redução de 30% no final das 48 horas. Os complementados  $\Delta visP/\Delta wzzfepE/visP+$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST/visP+$  apresentaram redução de 47% e 18% na motilidade ao final das 48 horas, respectivamente.

#### 4.2. Análise da expressão gênica

Com o intuito de observar a expressão gênica relativa da flagelina de *S. Typhimurium* em cada uma das cepas comparativamente à cepa selvagem, foi

realizada a técnica de qRT-PCR para analisar a expressão do gene responsável pela produção da flagelina (*fliC*) em condições de meio rico (LB convencional) e condições aumentadas de sal (LB 2% NaCl) a fim de observar uma possível expressão diferencial em condição de estresse. As Figuras 12 e 13 ilustram a expressão relativa do gene *fliC* em LB 1% NaCl e LB 2% NaCl, respectivamente.

**Figura 12.** Expressão relativa de *fliC* em LB 1% NaCl

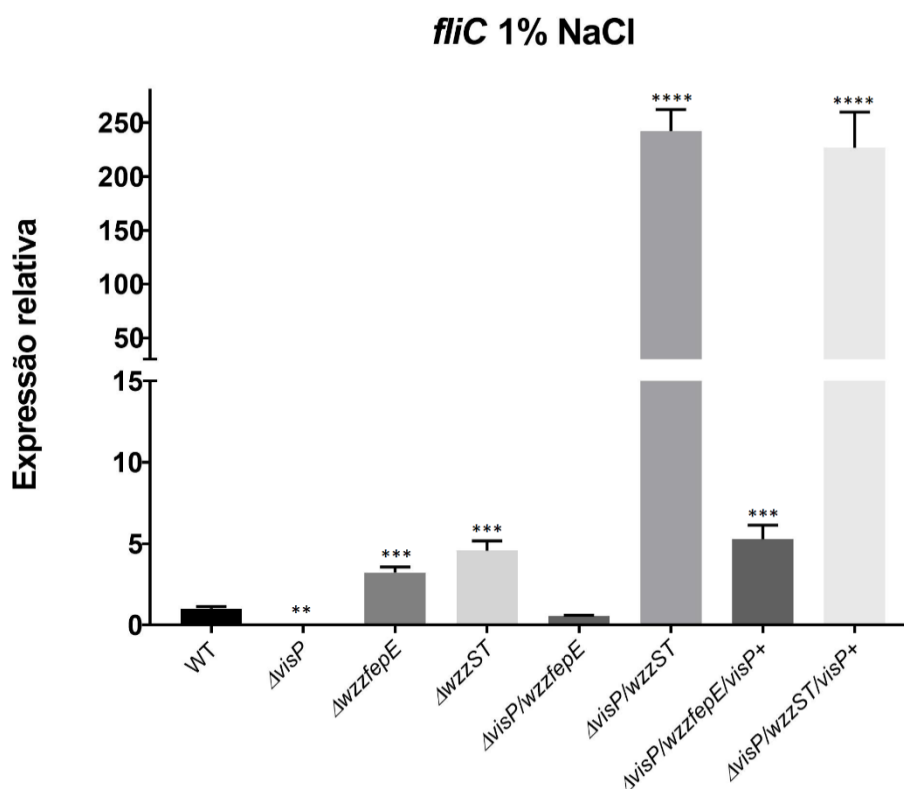


Figura 12. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *fliC* nos diferentes mutantes em meio LB 1% NaCl. A expressão foi calculada pelo método de *Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta Ct$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,01$  (\*\*),  $P < 0,001$  (\*\*\*) e  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*).

**Figura 13.** Expressão relativa de *fliC* em LB 2% NaCl

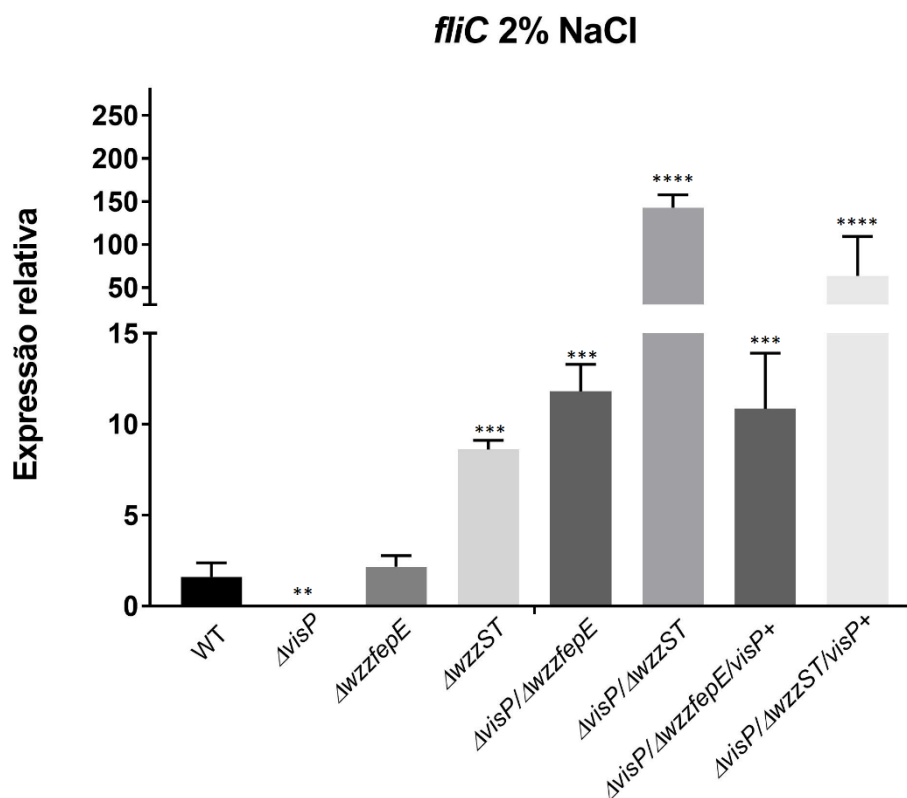


Figura 13. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *fliC* nos diferentes mutantes em meio LB 2% NaCl. A expressão foi calculada pelo método de *Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta Ct$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,01$  (\*\*),  $P < 0,001$  (\*\*\*) e  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*).

Durante a extração de RNA em meio LB 2% NaCl é importante ressaltar que a  $DO_{600}$  de 1,0 de todas as cepas testadas foi obtida após 3 horas de incubação, com exceção do mutante  $\Delta visP$  que levou cerca de 6 horas. Em condições normais (1% NaCl) não foi observada diferença de crescimento entre este mutante e os demais. A cepa WT apresentou o gene *fliC* aumentado 1,6 vezes em condições de 2% NaCl, e no mutante  $\Delta visP$  não foi detectada expressão em nenhuma das duas condições. Já o mutante  $\Delta wzzfepE$  mostrou aumento de 3 vezes em 1% e 2 vezes em 2% de NaCl comparativamente à selvagem, enquanto que  $\Delta wzzST$  em 1% registrou aumento de 4,5 vezes e 2% aumento de 8,6 vezes em relação à WT. O duplo mutante  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$ , que em meio LB 1% NaCl mostrou expressão reduzida pela metade, registrou aumento de 11 vezes na expressão em meio LB 2% NaCl comparativamente à WT. Já o duplo mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$  mostrou aumento da transcrição de *fliC*

cerca de 242 vezes em meio LB convencional e cerca de 143 vezes em meio LB 2% NaCl.

Os duplos mutantes complementados  $\Delta visP/\Delta wzzfepE/visP+$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST/visP+$  mostraram tendência semelhante aos seus respectivos não complementados, sendo que o primeiro registrou aumento de 5 vezes na expressão a 1% NaCl e 10 vezes na expressão a 2% NaCl; e o segundo registrou aumento de 226 vezes em meio 1% e 63 vezes em meio 2% de NaCl. Em seguida foram realizados ensaios de expressão dos genes de quimiotaxia *cheA* e *cheZ*, genes de resposta ao estresse osmótico *envZ* e *rpoS*, o anti- $\sigma^{28}$  *flgM*, o sensor quinase *qseC* e o gene *visP*. As Figuras 14 e 15 ilustram a expressão gênica relativa dos genes *cheA* e *cheZ* respectivamente.

**Figura 14.** Expressão relativa de *cheA*

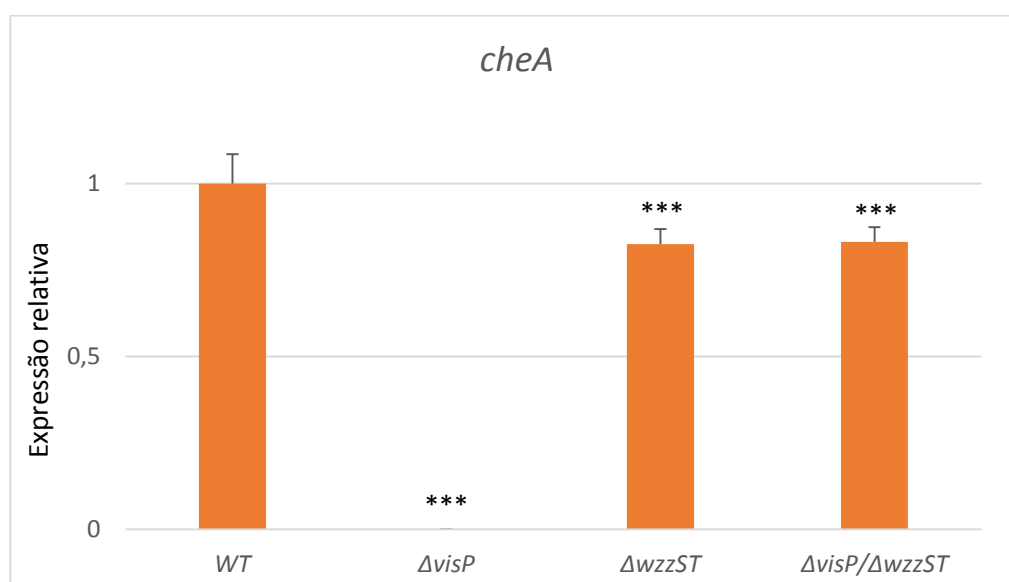


Figura 14. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *cheA* nos diferentes mutantes em meio LB. A expressão foi calculada pelo método de *Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta Ct$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,001$  (\*\*\*).

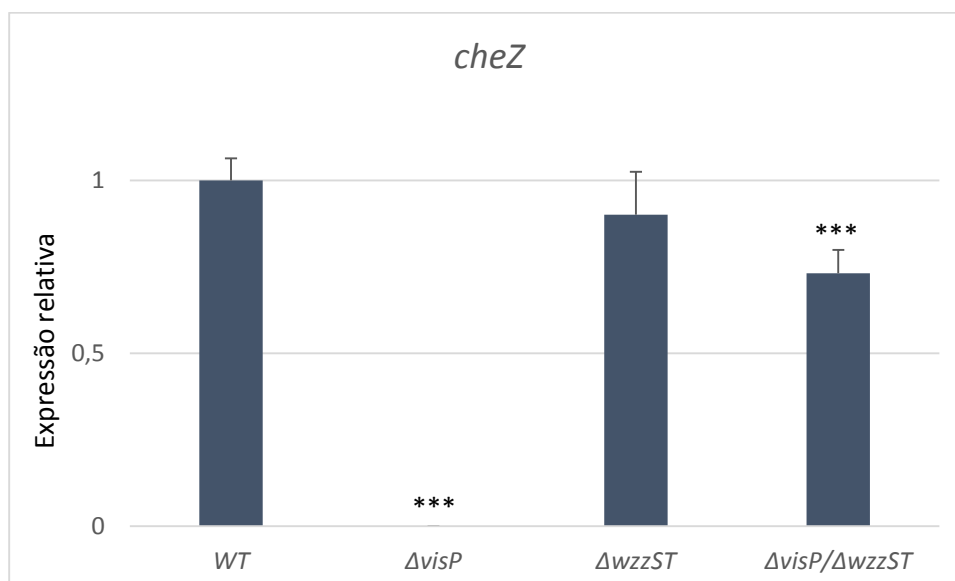
**Figura 15.** Expressão relativa de *cheZ*

Figura 15. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *cheZ* nos diferentes mutantes em meio LB. A expressão foi calculada pelo método de *Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta Ct$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,001$  (\*\*\*)

Devido às diferenças observadas na cepa  $\Delta visP/\Delta wzzST$  quanto à expressão da flagelina, foi realizada a análise da expressão gênica do mutante  $\Delta visP$ , do mutante simples  $\Delta wzzST$  e do duplo  $\Delta visP/\Delta wzzST$  para observar as diferenças promovidas pelos diferentes nocautes. Novamente, o mutante  $\Delta visP$  não apresentou níveis detectáveis de expressão dos genes *cheA* e *cheZ*,  $\Delta wzzST$  mostrou diferença significativa apenas na expressão de *cheA* e a cepa  $\Delta visP/\Delta wzzST$  apresentou redução estatisticamente significativa para ambos os genes quando comparada à cepa selvagem. As Figuras 16 e 17 ilustram a expressão relativa dos genes *rpoS* e *envZ* respectivamente.

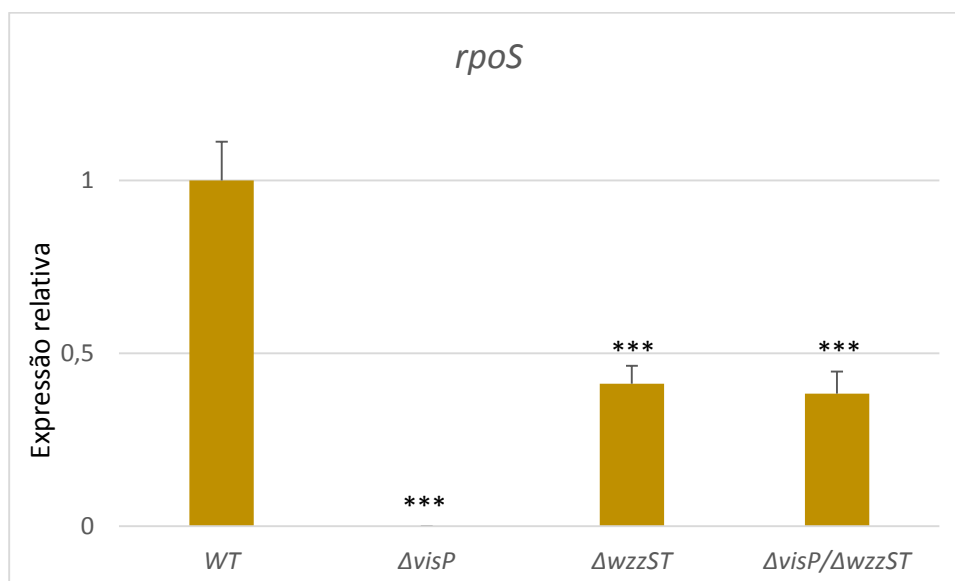
**Figura 16.** Expressão relativa de *rpoS*

Figura 16. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *rpoS* nos diferentes mutantes em meio LB. A expressão foi calculada pelo método de *Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta Ct$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,001$  (\*\*\*)).

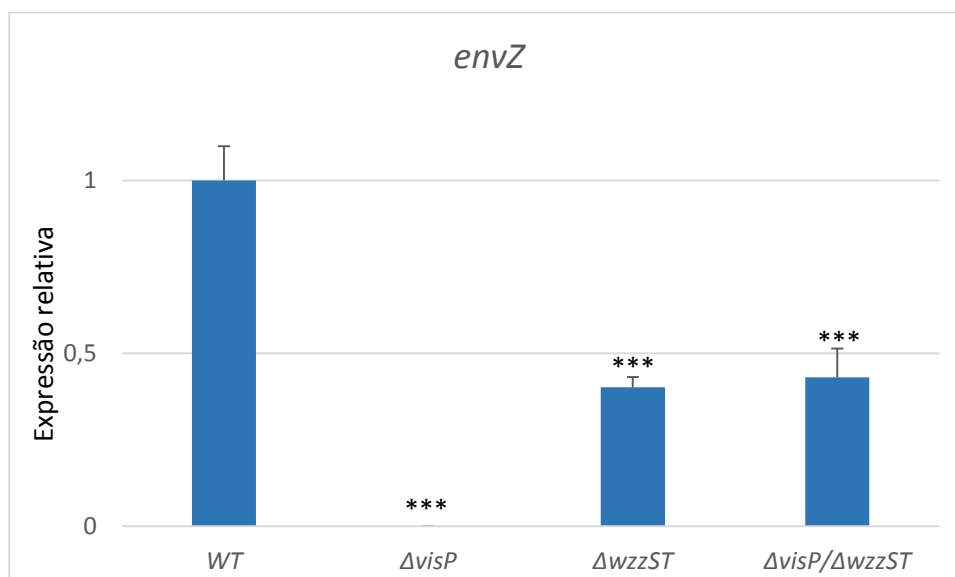
**Figura 17.** Expressão relativa de *envZ*

Figura 17. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *envZ* nos diferentes mutantes em meio LB. A expressão foi calculada pelo método de

*Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta C_t$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,001$  (\*\*\*)).

Tanto para o gene *rpoS* como para o gene *envZ*, ocorreu redução significativa da expressão em todos os mutantes quando comparados à cepa selvagem. O mutante  $\Delta visP$  não apresentou níveis detectáveis de expressão para os genes relacionados à resposta ao estresse osmótico, enquanto que  $\Delta wzzST$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST$  apresentaram redução de mais da metade da expressão comparativa à selvagem para ambos os genes testados. As Figuras 18 e 19 ilustram a expressão gênica relativa dos genes *flgM* e *qseC* respectivamente.

**Figura 18.** Expressão relativa de *flgM*

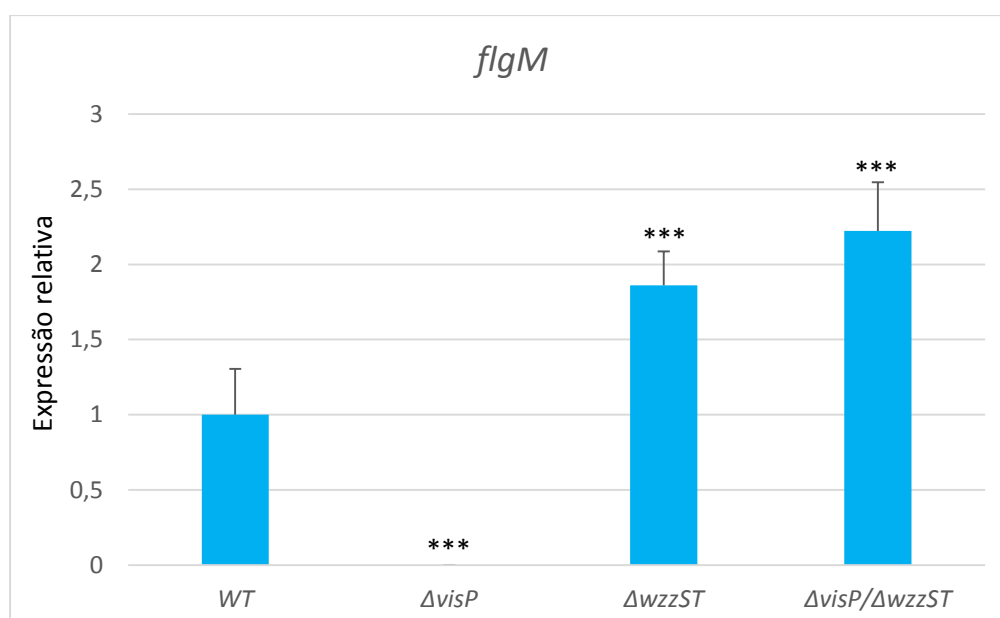


Figura 18. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *flgM* nos diferentes mutantes em meio LB. A expressão foi calculada pelo método de *Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta C_t$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,001$  (\*\*\*)).



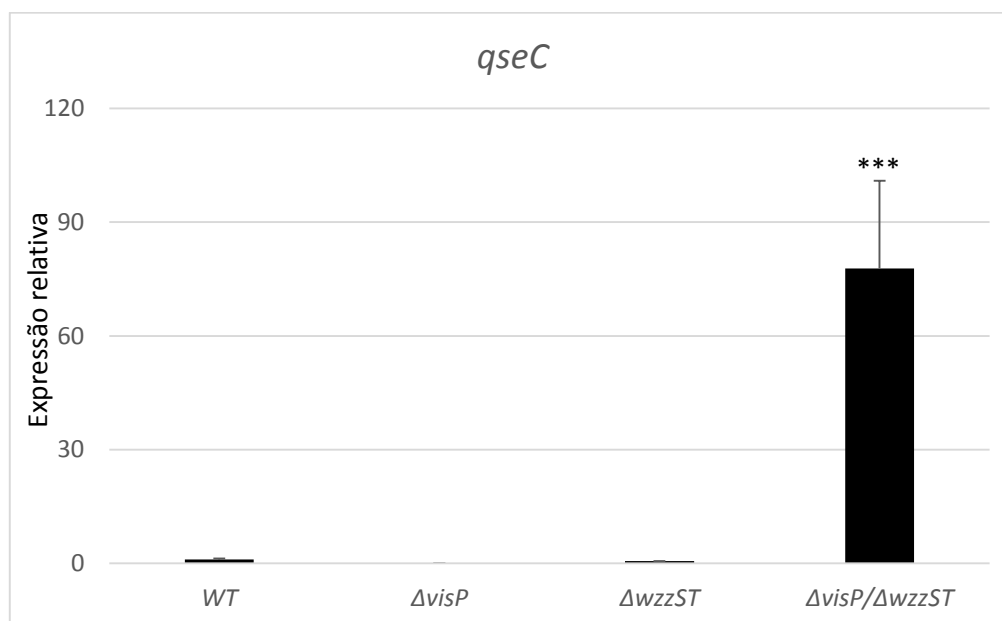
**Figura 19.** Expressão relativa de *qseC*

Figura 19. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *qseC* nos diferentes mutantes em meio LB. A expressão foi calculada pelo método de *Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta Ct$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,001$  (\*\*\*) .

A expressão de *flgM* foi altamente significativa em todos os mutantes quando comparados à selvagem. Não foi detectada expressão em  $\Delta visP$ , no mutante  $\Delta wzzST$  a expressão detectada foi de 1,8 vezes e na cepa  $\Delta visP/\Delta wzzST$  a expressão foi duas vezes maior que a observada na WT. Para o gene *qseC*, não foi vista diferença significativa nos mutantes  $\Delta visP$  e  $\Delta wzzST$ . Já o mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$  apresentou um aumento de cerca de 80 vezes na expressão de *qseC* quando comparado à cepa selvagem. A Figura 20 ilustra a expressão relativa do gene *visP* nas cepas selvagem,  $\Delta wzzfepE$  e  $\Delta wzzST$ .

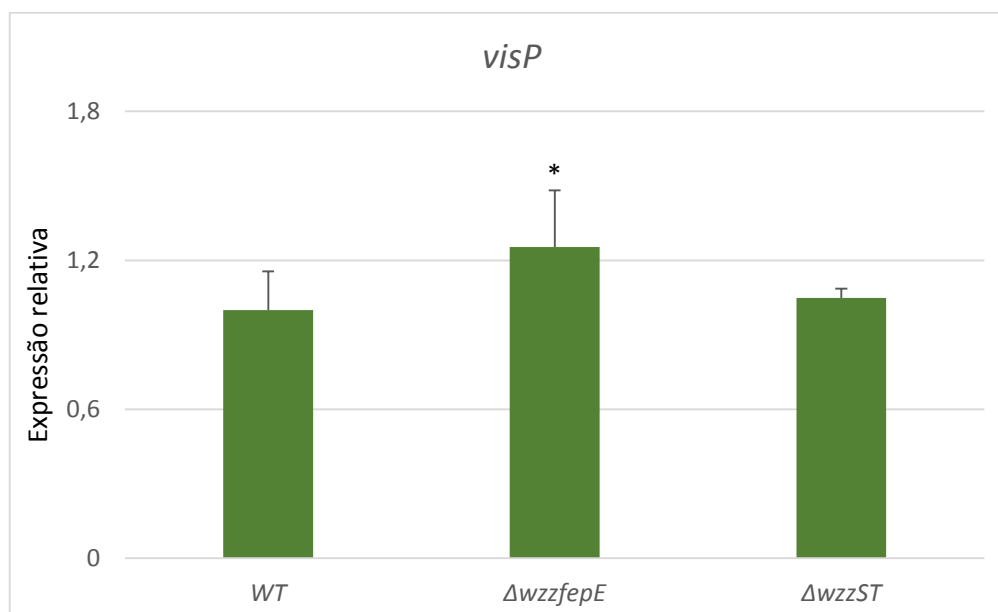
**Figura 20.** Expressão relativa de *visP*

Figura 20. Expressão gênica relativa aos níveis de *S. Typhimurium* selvagem (WT) do gene *visP* nos diferentes mutantes em meio LB. A expressão foi calculada pelo método de *Comparative Critical Threshold* ( $\Delta\Delta Ct$ ) conforme previamente descrito (Walters e Sperandio, 2006).  $P < 0,05$  (\*).

A expressão do gene *visP* no mutante  $\Delta wzzfepE$  mostrou um leve aumento, estatisticamente significativo comparado à cepa selvagem, enquanto que no mutante  $\Delta wzzST$  não foi vista diferença significativa. Foi feita por fim a análise da expressão gênica do gene *fljB* para a cepa selvagem e os mutantes  $\Delta visP$ ,  $\Delta wzzST$  e  $\Delta wzzfepE$ , no entanto sua expressão não foi detectada em nenhuma das cepas testadas.

### 4.3. Extratos proteicos

Para checar detalhes da expressão de proteínas totais em cada uma das cepas, foram realizados lisados bacterianos para análise dos distintos extratos proteicos, para serem visualizados via SDS-PAGE, assim como padronização dos protocolos e normalização da concentração destes extratos entre si, tanto do lisado bacteriano obtido via rompimento da membrana por temperatura como do extrato de proteínas obtido a partir da sonicação. Para as cepas WT,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$  e

$\Delta visP/\Delta wzzST$  foram aplicados 15  $\mu$ L em cada canaleta e para  $\Delta visP$  foram aplicados 30  $\mu$ L. A Figura 21 denota o SDS-PAGE feito a partir do lisado bacteriano.

**Figura 21.** SDS-PAGE do lisado bacteriano

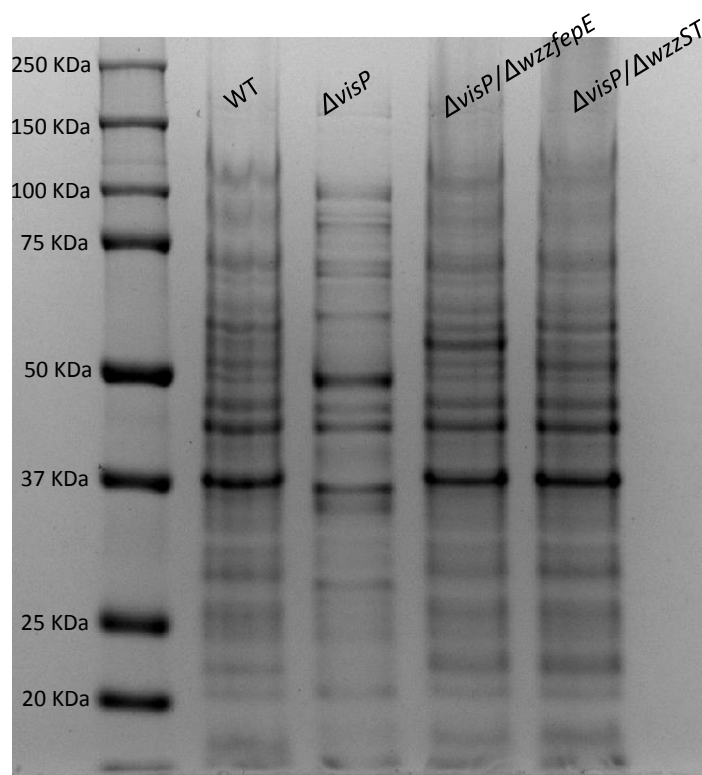


Figura 21. SDS-PAGE feito em gel de poliacrilamida 12% e corado com Coomassie. O ladder indica o tamanho das bandas correspondentes (kDa).

A Figura 22 ilustra o SDS-PAGE feito com as cepas utilizando o extrato de proteínas. Para as cepas WT,  $\Delta visP/visP+$ ,  $\Delta wzzfepE$ ,  $\Delta wzzST$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzST$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE/visP+$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST/visP+$  foram aplicados 15  $\mu$ L em cada canaleta e para  $\Delta visP$  foram aplicados 30  $\mu$ L.

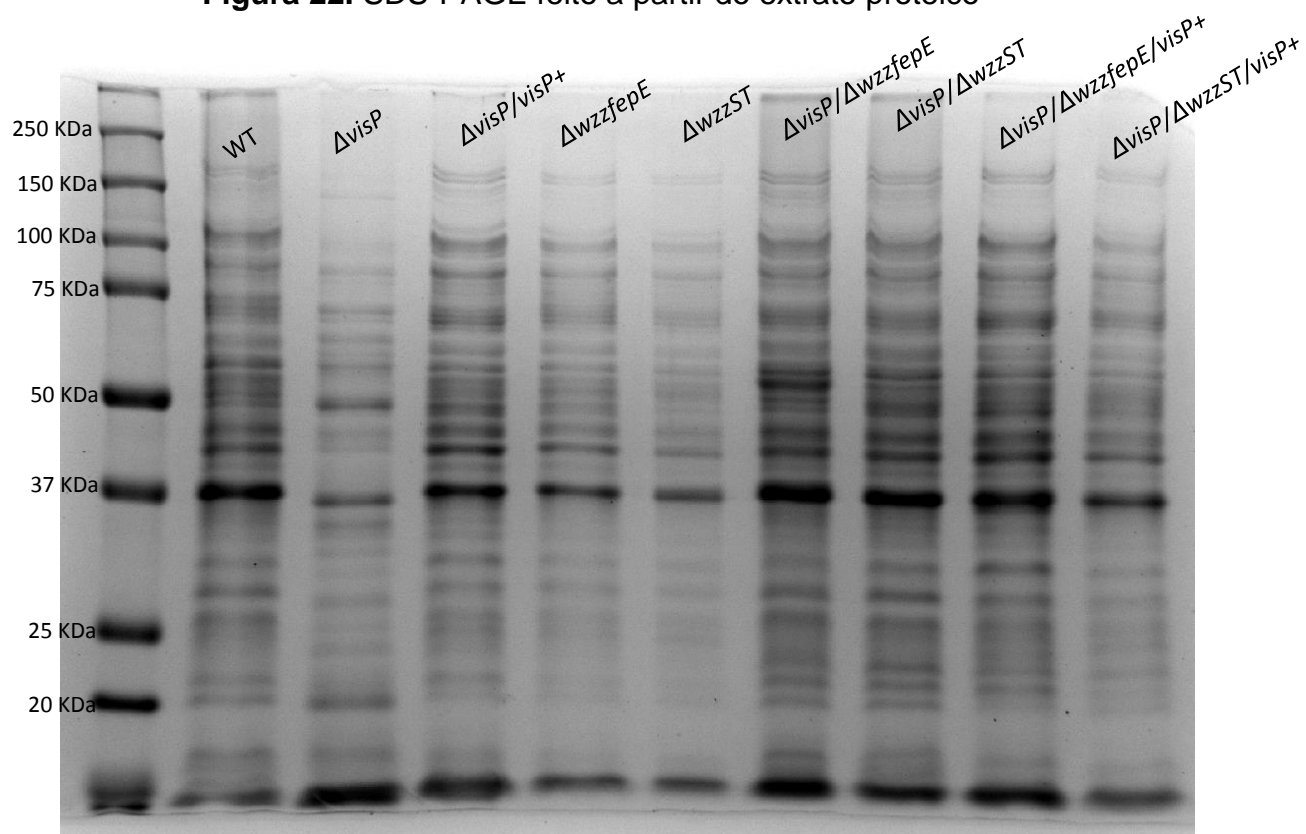
**Figura 22.** SDS-PAGE feito a partir do extrato proteico

Figura 22. SDS-PAGE feito em gel de poliacrilamida 12% e corado com Coomassie. O ladder indica o tamanho das bandas correspondentes (kDa).

#### 4.4. *Western blot e imunoblot*

Para verificação da expressão da proteína flagelar FliC em cada uma das cepas, foi feita uma corrida idêntica de outro gel para transferência e revelação com anticorpos anti-FliC (flagelina) e anti-RpoA (normalizador, RNA polimerase subunidade A), paralelamente aos géis corados com Coomassie. A Figura 23 ilustra o *imunoblot* correspondente ao gel visto na Figura 18, e a expressão da flagelina FliC e da proteína RpoA em cada uma das cepas WT,  $\Delta visP$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST$ .

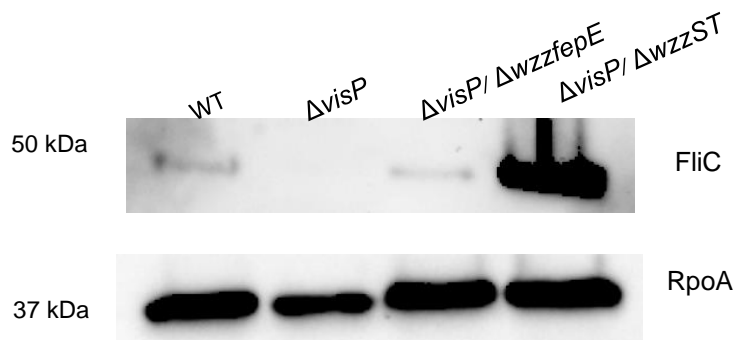
**Figura 23.** Expressão de FliC e RpoA no lisado bacteriano

Figura 23. *Imunoblot* das proteínas FliC e RpoA feito a partir do lisado bacteriano. A legenda indica o peso molecular de cada uma das proteínas (kDa).

A Figura 24 ilustra o *imunoblot* correspondente ao gel visto na Figura 18, dessa vez utilizando o extrato de proteínas. Pode-se observar a expressão das proteínas FliC e RpoA nas cepas WT,  $\Delta visP$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST$ .

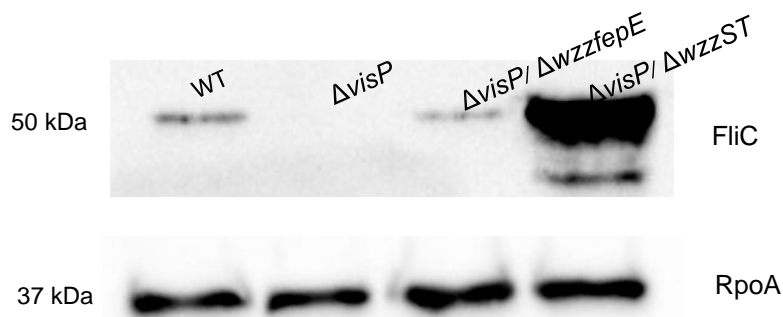
**Figura 24.** Expressão de FliC e RpoA no extrato proteico

Figura 24. *Imunoblot* das proteínas FliC e RpoA feito a partir do extrato de proteínas. A legenda indica o peso molecular das proteínas (kDa).

A Figura 25 ilustra o *imunoblot* correspondente ao gel visto na Figura 19, e a expressão da flagelina FliC em cada uma das cepas WT,  $\Delta visP$ ,  $\Delta visP/visP+$ ,  $\Delta wzzfepE$ ,  $\Delta wzzST$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzST$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE/visP+$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST/visP+$ .

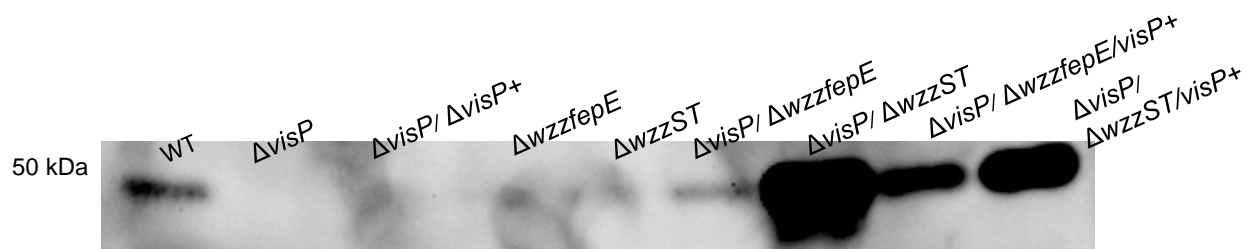
**Figura 25.** Expressão de FliC no extrato proteico

Figura 25. *Imunoblot* da proteína FliC feito a partir do extrato proteico. A legenda indica o peso molecular da proteína (kDa).

#### 4.5. Microscopia

A caracterização microscópica flagelar de cada uma das cepas foi realizada por meio de ensaios de microscopia, e assim foram visualizadas algumas diferenças nos padrões de motilidade das cepas do estudo. A cepa selvagem apresentou bacilos de tamanhos diversos, movimentação contínua e muito rápida e mudança rápida de trajetória. Foram detectados em média 0,5 bacilos longos por campo e em média 3 células imóveis por campo. O mutante  $\Delta visP$  apresentou bacilos predominantemente mais longos, movimento contínuo em apenas algumas células e lenta mudança de trajetória. Foram detectados cerca de 3,9 bacilos longos por campo e 20,5 células imóveis por campo. O mutante  $\Delta wzzST$  apresentou movimentação lenta, porém contínua e mudança lenta de trajetória. Foram contados em média 0,8 bacilos longos por campo e 4,5 células imóveis por campo. O mutante  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$  apresentou movimento contínuo porém mais lento que a WT e mudança mais lenta na trajetória. Foram detectados em média 1,8 bacilos longos por campo e 6,7 células imóveis por campo. Por fim, o mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$  apresentou bacilos de diversos tamanhos, lenta movimentação e mudança lenta de trajetória. Foram contados cerca de 0,8 bacilos longos por campo e 5 células imóveis por campo. As Figuras 26 e 27 ilustram a quantidade média de bacilos longos por campo e de células imóveis por campo, respectivamente.

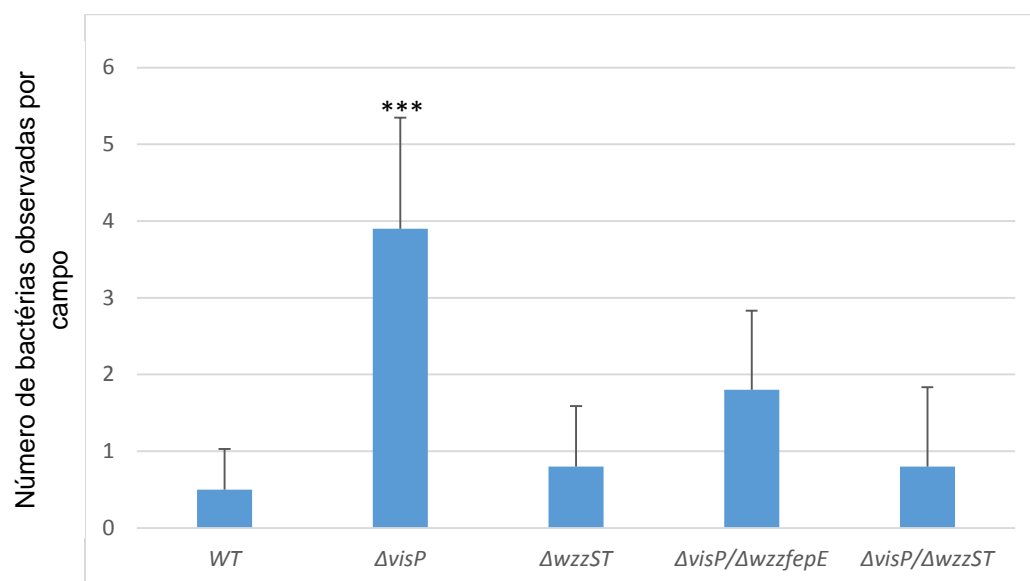
**Figura 26.** Quantidade média de bacilos longos por campo

Figura 26. Quantidade média de bacilos longos por campo após observação de 10 campos.

Após análise estatística, verificou-se que o número de bacilos longos no mutante  $\Delta visP$  apresentou alta significância comparativamente à selvagem. Além disso, este mutante apresentou uma média de 2 a 3 septos de divisão/campo observado.

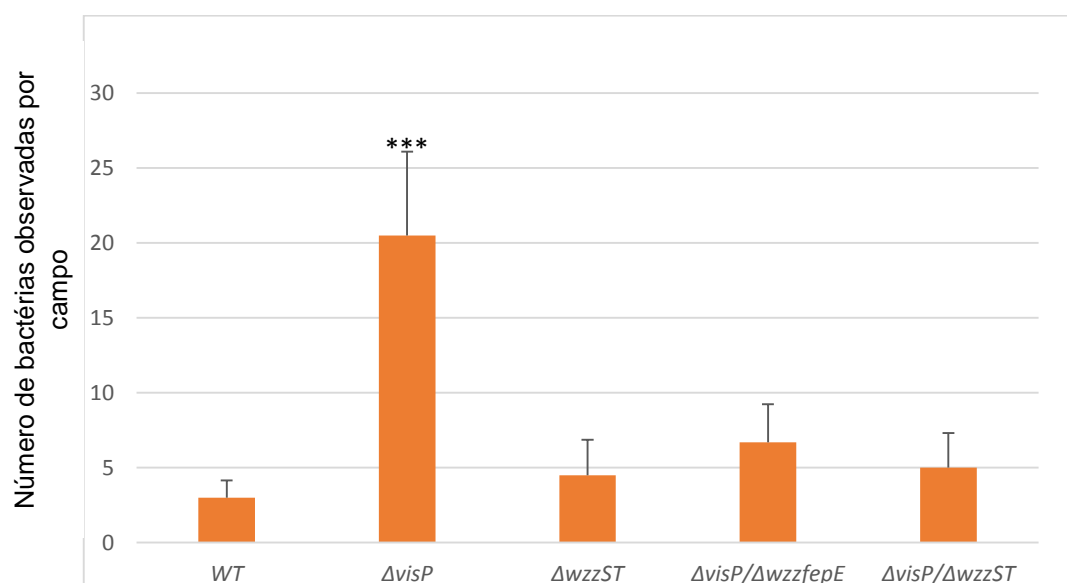
**Figura 27.** Quantidade média de células imóveis por campo

Figura 27. Quantidade média de células imóveis por campo após observação de 10 campos.

Após análise estatística foi verificada novamente alta significância estatística no mutante  $\Delta visP$ .

## 5. Discussão

O flagelo consiste em uma maquinaria capaz de transformar a força prótica motriz em energia mecânica, culminando em movimentação. A movimentação responde a fatores ambientais, sendo que em superfícies líquidas e semissólidas o movimento é facilitado, enquanto que em superfícies sólidas e gradientes de viscosidade, o motor flagelar gera maior torque, recrutando as proteínas estatoras de maneiras distintas (Lele *et al.*, 2013). O flagelo é rotacionado de acordo com disponibilidade de íons de hidrogênio e sódio, gerando movimento rápido além de auxiliar no mecanismo de virulência bacteriano. Através dos ensaios de motilidade do tipo *swimming* e *swarming*, foi possível observar que o mutante  $\Delta visP$  possui um fenótipo reduzido quando comparado à cepa selvagem. Nota-se grande diferença entre  $\Delta visP$  e WT no *swimming*, no entanto para o ensaio de *swarming* a diferença entre estas cepas somente é observada na concentração de 2% de cloreto de sódio. A diferença estatística vista entre o mutante  $\Delta visP$  e WT é altamente significativa durante o *swimming*, enquanto no *swarming* a 1% de NaCl não foi observada tal diferença, indicando que a alteração da concentração do meio e redução da quantidade de água disponível na superfície alterou a motilidade das cepas. O mutante  $\Delta visP$  parece estar utilizando um mecanismo diferente e independente de flagelos durante o *swarming*. Como não foram detectadas a expressão de nenhum dos genes flagelares, genes de quimiotaxia e presença da proteína FliC, o flagelo não é um agente facilitador neste caso, podendo haver a participação de complexos focais de adesão (*gliding*), pili tipo IV (*twitching*) ou movimentação facilitada via secreção de surfactantes e crescimento (*sliding*) (Kearns, 2010; Park *et al.*, 2015). A ausência de flagelos funcionais em  $\Delta visP$  faz com que este mutante seja atenuado durante invasão em células HeLa, o qual a motilidade possui papel essencial na busca de nutrientes e nichos de colonização (Da Silva, 2016).

Os mutantes  $\Delta wzzfepE$ ,  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$  e  $\Delta wzzST$  apresentaram fenótipos semelhantes à WT durante o *swimming*, motilidade aumentada durante o *swarming* a 1% NaCl e motilidade reduzida durante o *swarming* a 2% NaCl. O aumento da



concentração de sal no meio pode promover dificuldade de crescimento e maior gasto energético para manutenção da membrana celular, como o mecanismo regulador de porinas, além de possivelmente ativar mecanismos de resposta a estresse bacteriano. Em um estudo de ativação de genes não flagelares pelo ativador transcricional FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> em *E. coli* verificou-se que o gene *wzzfepE* se liga a este complexo *in vitro* e mostrou ser dependente *in vivo* deste regulador (Stafford *et al.*, 2005). A deleção dos genes ligados ao antígeno-O poderiam prejudicar a capacidade da *Salmonella* de resistir a ambientes de maior osmolaridade, assim como o lúmen intestinal. O LPS intacto pode ter um papel de proteção e integridade da membrana. Em um estudo de *swarming* feito por Toguchi e colaboradores foi evidenciado que as cepas de *S. Typhimurium* mutantes em LPS apresentaram baixa motilidade em superfície, e após adição de surfactina a motilidade foi recuperada. Isso ilustra que a recuperação do fenótipo destes mutantes é consistente com a ideia de que o antígeno-O pode ter o papel de surfactante ou aumento da “molhabilidade” (tradução livre do inglês) no meio durante o *swarming* (Toguchi *et al.*, 2000). O papel do LPS ficou evidente também em um estudo realizado por Brown e Häse, onde foi visto que após adição de surfactina, a motilidade em superfície era recuperada em mutantes de LPS e flagelos tanto em *V. cholerae* como em *E. coli* (Brown e Häse, 2001). O mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$ , apesar de superexpressar o gene *fliC* cerca de 250 vezes mais que a WT em 1% NaCl, 150 vezes mais que a WT em 2% NaCl e superproduzir a proteína FliC, este apresenta fenótipo 37% menor em *swarming* 1% NaCl e 30% menor em *swarming* 2% NaCl. Dessa forma, entende-se que a retirada do gene *visP* implica em grande redução da motilidade bacteriana, e a retirada de um segundo gene ligado ao antígeno-O (*wzzST* ou *wzzfepE*) de alguma forma recupera a motilidade do tipo *swimming*, podendo estes estarem envolvidos com o equilíbrio da membrana celular, com as diferentes formas de distintos comprimentos da cadeia de antígeno-O do LPS de *S. Typhimurium*, e podendo assim agir de forma compensatória através de um mecanismo ainda desconhecido. No entanto este padrão não pode ser aplicado ao *swarming*, visto que a motilidade em superfície pode depender de diversos outros fatores, tais como disponibilidade de água na superfície, funcionamento adequado dos componentes flagelares como as proteínas estatoras, quimiotaxia e sinalização química (Partridge e Harshey, 2013b). Em um estudo anterior realizado pelo grupo, foi visto que VisP é importante durante a montagem das cadeias do antígeno-O em

*S. Typhimurium*, podendo esta ser uma explicação na montagem e/ou funcionamento dos flagelos neste patógeno (Da Silva, 2016).

Diferenças na expressão gênica foram observadas para distintos genes utilizados no estudo. Diretamente através da análise da expressão gênica via qRT-PCR foi possível observar a resposta ao estresse promovido pela adição de cloreto de sódio ao meio, sendo que as cepas responderam de formas diferentes quanto à transcrição do gene *fliC* responsável pela flagelina. Quando é feita a análise utilizando meio LB convencional (1% NaCl) como o normalizador, a expressão de *fliC* na cepa selvagem em LB 2% NaCl é cerca de meia ordem de magnitude maior, sendo que para todos os demais mutantes também é observado aumento na expressão de *fliC* em maior osmolaridade. Em um estudo realizado com *S. Typhi* foi evidenciado que o flagelo é regulado positivamente em maior osmolaridade, enquanto que a cápsula é regulada negativamente, e esta situação se inverte quando a bactéria alcança o epitélio (Winter *et al.*, 2009). Essa diferença na transcrição da flagelina não é notada no *swimming*, porém durante o *swarming* observa-se um aumento no fenótipo da WT em meio de maior osmolaridade após 48 horas de incubação. Em um estudo anterior realizado pelo grupo foi observada diminuição significativa na expressão de *flhDC* (operon mestre flagelar) no mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$ , aumento significativo na expressão de *fliA* ( $\sigma^{28}$ ) nos mutantes  $\Delta wzzfepE$  e  $\Delta visP/\Delta wzzfepE$ , e aumento significativo na expressão de *motA* (rotor flagelar) no mutante  $\Delta wzzfepE$ . Todos foram analisados em condições de meio rico (LB 1% NaCl) e o mutante  $\Delta visP$  não apresentou expressão detectável dos genes testados (Da Silva, 2016). Desse modo, observa-se que o mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$ , apesar da superprodução de flagelina observada, apresenta uma redução da transcrição do operon flagelar (genes classe 1), do fator de transcrição da montagem flagelar (classe 2) e de genes responsáveis pelo rotor (*motA*).

A expressão dos genes *cheA* e *cheZ* não foi detectada no mutante  $\Delta visP$ , assim como ocorreu no gene *fliC* e com os demais genes flagelares previamente testados (Da Silva, 2016). O mutante  $\Delta wzzST$  apresentou redução da expressão de *cheA*, enquanto que  $\Delta visP/\Delta wzzST$  apresentou redução tanto em *cheA* como em *cheZ*. Entretanto, mesmo que a diferença na expressão tenha sido estatisticamente significativa, a redução foi menor do que meia ordem de magnitude, o que em expressão gênica pode não representar uma variação consistente. O sistema de dois componentes CheAB está no topo da cascata de quimiotaxia, e a proteína

CheA fosforilada transfere o grupamento fosfato ao sistema CheYZ, responsável pela direção da rotação flagelar, sendo que o sentido anti-horário desloca a célula para a frente, e o sentido horário dispersa o movimento, gerando mudança de direção (Parkinson, 1993). O sistema quimiotático desempenha um papel mecânico durante o *swarming*, auxiliando a bactéria a se deslocar sobre superfícies, inclusive aumentando a “molhabilidade” do meio (Mariconda *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

A expressão de *rpoS* não foi detectada em  $\Delta visP$ , o que corrobora com a dificuldade deste mutante em resposta a estresse, já que o gene *rpoS* está no topo da cascata de resposta a agentes de estresse osmótico, oxidativo, radiação UV, choques térmicos, pH ácido, etanol, condições de microaerofilia, entre outros (Hengge-Aronis, 2002). Os mutantes  $\Delta wzzST$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST$  também apresentaram redução considerável na expressão de *rpoS*. Embora a resposta específica tende a eliminar o estresse e mediar a ação do reparo de danos celulares, a resposta geral ao estresse torna a célula mais resistente de modo que os danos sejam evitados ao invés de serem reparados (Hengge-Aronis, 2002).

Já a expressão do gene *envZ*, novamente todos os mutantes testados apresentaram redução altamente significativa. EnvZ é uma proteína detectora que transfere um grupamento fosfato para seu regulador OmpR, que em enterobactérias está relacionado a resposta ao estresse osmótico. Em *S. Typhi*, OmpR se liga a *tviA*, gene responsável pela cápsula, enquanto quem em *S. Typhimurium* ele regula as ilhas SPI-1 e SPI-2 através de SsrAB (Perkins *et al.*, 2013). OmpR tende a inibir a expressão de *flhDC* (Osterman *et al.*, 2015) e a baixa expressão de seu sensor cognato nas cepas testadas pode corroborar com o aumento visto na produção de flagelina.

Na análise do gene *flgM* quanto a sua expressão comparativa à selvagem, não foi identificada expressão no mutante  $\Delta visP$ , o que já era esperado visto que esta cepa não apresenta expressão do regulador *flhDC* (Da Silva, 2016). Já nos mutantes  $\Delta wzzST$  e  $\Delta visP/\Delta wzzST$  a expressão se mostrou elevada, o que corrobora com o que foi observado anteriormente pelo grupo após análise da expressão de *fliA*: sua expressão reduzida no mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$  corrobora com o aumento da expressão de *flgM* na cepa. A proteína FlgM regula os genes de classe 3 flagelares, e sua exportação via sistema de secreção do flagelo permite que  $\sigma^{28}$  (*fliA*) inicie a transcrição. Cerca de 80% de FlgM provém da secreção de classe 3 (Wang *et al.*, 2005) e após sua exportação da célula, os operons *flgKL*, *fliDST*,

*flgMN*, *fliC*, *cheRBYZ*, *motAB*, *cheAW*, *fliAZY*, *trg*, *tsr*, *tar* e *tap* são transcritos (Osterman *et al.*, 2015). O desequilíbrio de genes de classe 3 observado em  $\Delta visP/\Delta wzzST$  pode estar relacionado ao aumento da expressão de *flgM*, entre outras vias que podem interagir com o operon mestre flagelar. Em um estudo anterior foi evidenciado que a deleção do gene *flgM* promove um aumento da transcrição de genes classe 3, causando perda do controle temporal da montagem flagelar e atenuando *S. Typhimurium in vivo* (Lai *et al.*, 2013).

A expressão do sensor quinase *qseC* não apresentou diferenças significativas em  $\Delta visP$  e  $\Delta wzzST$ , no entanto o duplo mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$  apresentou-se altamente superexpresso, aproximadamente 80 vezes aumentado em relação aos níveis da cepa selvagem. Em EHEC, o sistema QseBC se mostrou importante para ativação da ilha de patogenicidade LEE, transcrição do flagelo e produção de toxina de Shiga (Sperandio *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2006). Em *S. Typhimurium*, foi evidenciado que o mutante  $\Delta qseC$  é atenuado no modelo de infecção suíno, e possui motilidade reduzida em meio contendo norepinefrina (Bearson e Bearson, 2008). A partir destas informações, o resultado observado de superexpressão de *qseC* e *fliC* no mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$  está de acordo com o papel da proteína quinase QseC para a motilidade de *S. Typhimurium*. Maiores estudos serão necessários para elucidar os detalhes desta relação entre antígeno-O, flagelo e o sensor quinase neste patógeno.

A expressão do gene *visP* no mutante  $\Delta wzzST$  não mostrou diferença significativa, enquanto que em  $\Delta wzzfepE$  a expressão estava um pouco aumentada. Para este mutante, foi observado aumento na motilidade *swarming* a 2% de NaCl após 48 horas de incubação. A proteína VisP está presente em diferentes espécies bacterianas como *Erwinia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Serratia*, entre outras e sua importância para virulência e funcionamento adequado celular foi elucidada anteriormente (Moreira *et al.*, 2013). Desta forma, são necessários novos estudos para total compreensão das redes regulatórias que envolvem a proteína VisP e a virulência de *S. Typhimurium*.

A expressão de *fljB* – a flagelina secundária de *S. Typhimurium* – não foi detectada nas cepas provavelmente devido à fase de crescimento no qual o RNA foi analisado, em fase log tardia de  $DO_{600}$  1.0. A flagelina FljB está relacionada à fase estacionária do crescimento bacteriano e também está ligada a condições de hiperosmolaridade (Zheng *et al.*, 2016). No entanto, sua participação durante o

processo patogênico e mecanismo de evasão do sistema imunológico permanecem desconhecidos na literatura.

A análise da expressão das proteínas apresentadas pelas amostras do estudo de formas distintas fenotipicamente veio a corroborar com a análise inicial observada quando comparada com a expressão gênica de genes correlatos. Através do SDS-PAGE foi possível observar os padrões de proteínas da cepa selvagem e de cada um de seus mutantes isogênicos. Tanto no lisado bacteriano como no extrato proteico foram vistos padrões semelhantes de proteínas entre as cepas, com exceção do mutante  $\Delta visP$ , que aparentou possuir uma quantidade menor de proteínas totais tanto citoplasmáticas como de membrana bacteriana, quando comparadas a intensidade das bandas, e também apresentou uma banda intensa em ambos os géis na altura de 50 kDa. Quando comparada ao *imunoblot*, verificou-se que esta banda na altura de 50 kDa (peso molecular da flagelina FliC) não é observada na membrana, com a utilização do anticorpo monoclonal anti-FliC. A expressão da proteína FliC indica presença de flagelo maduro, e o resultado visto no mutante  $\Delta visP$  no *imunoblot* parece estar de acordo com o fenótipo visto de baixa motilidade nos ensaios de *swimming* e *swarming*. Mesmo após a complementação deste mutante com o gene *visP* não foi detectada presença da flagelina. Outro resultado interessante foi visto no duplo mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$ , onde verificou-se uma superprodução da flagelina FliC quando comparada à WT, o que aparentemente não influencia o fenótipo de motilidade como visto nos ensaios de *swimming* e *swarming*. A complementação deste duplo mutante com o gene *visP* diminuiu levemente essa superprodução de FliC, porém a motilidade ainda assim não é recuperada.

Quando comparados os resultados do *swarming* a 0,5% à expressão de FliC, é possível entender que a quantidade de FliC e flagelos não está influenciando a movimentação neste caso, uma vez que o mutante  $\Delta visP$  não apresentou expressão de FliC e seu fenótipo é semelhante à cepa selvagem. Os duplos mutantes que apresentam expressão de FliC aumentada não obtiveram fenótipo de motilidade diretamente proporcional a esta condição. Análises transcriptômicas feitas por Wang e colaboradores reportaram que em condições de *swarming*, cepas de *S. Typhimurium* mutantes de quimiotaxia (*che*) possuem atenuação somente em genes de classe 3 da montagem flagelar, e essa baixa é marcada pela inibição da exportação de FlgM da célula, o regulador negativo que se liga à FliA ( $\sigma^{28}$ ) e inibe a transcrição de genes classe 3 (Wang *et al.*, 2005). Além disso, um estudo conduzido

por Humphries e colaboradores mostrou que a variação de fase durante a regulação de fímbrias de *S. Typhimurium* possui papel importante durante a patogênese *in vivo*, sendo que *in vitro* a única fímbria que encontra-se ligada durante crescimento em caldo e placa é FimA (Humphries *et al.*, 2005). Outra fímbria que é expressa durante crescimento em placa é a fímbria *curly* (sua subunidade principal é ortóloga à fímbria agregativa de *S. Enteritidis*), e ambas poderiam contribuir para motilidade independente de flagelos, conforme previamente sugerido (Grund e Weber, 1988). A montagem do flagelo demanda energia, e um sistema regulatório pode ajudar a conservá-la em determinadas condições ambientais. *Salmonella* reprime seletivamente a expressão de flagelina durante infecção sistêmica, sugerindo que a evasão e sobrevivência ao sistema imunológico é crítica para o estabelecimento da infecção (Lai *et al.*, 2013). A literatura a respeito da estrutura flagelar é consistente, porém pouco se sabe sobre seu papel durante a patogênese e sua relação com os demais processos celulares, principalmente no que diz respeito à membrana bacteriana de Gram negativos.

A análise da movimentação microscópica revelou diferenças na motilidade do mutante  $\Delta visP$  e também em nuances no formato das células. Enquanto foram observados bacilos predominantemente mais curtos e com movimentação rápida na cepa selvagem, o mutante  $\Delta visP$  apresentou bacilos predominantemente mais longos e de baixa movimentação. Além disso, foi verificado um grande número de células imóveis em  $\Delta visP$ , o que pode justificar sua baixa motilidade do tipo *swimming*. O fenótipo de *swarming* observado no mutante  $\Delta visP$  foi semelhante ao visto na cepa selvagem, o que pode ser justificado com a quantidade de bacilos longos encontrados na microscopia. Algumas bactérias classificadas como “*robust swimmers*”, assim como *Proteus* e *Vibrio*, costumam passar por um processo de diferenciação ao iniciar o *swarming*, podendo ser aumento no número de flagelos ou alongamento celular (Harshey, 2003; Harshey e Partridge, 2015). Sabe-se que bactérias entéricas como *E. coli* e *Salmonella* são classificadas como “*temperate swimmers*” e não aumentam o número de flagelos por célula durante o *swarming*, no entanto é descrito um alongamento celular (Partridge e Harshey, 2013a). Os bacilos mais longos observados no mutante  $\Delta visP$  apresentavam cerca de 2 a 3 septos por célula, indicando supressão da divisão celular ou mesmo problemas na divisão comuns a outros enteropatógenos (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Como nos demais mutantes não foi detectada uma quantidade elevada tanto de bacilos longos como

de células imóveis por campo, pode-se concluir que a mutação em *visP* promove um desequilíbrio que pode afetar desde a membrana até a divisão celular. Em um estudo anterior realizado em *Escherichia coli* foi detectado que o regulador *flhD*, que faz parte do regulon flagelar *flhDC*, também pode afetar a divisão celular (Prüss e Matsumura, 1996) o que pode estar relacionado à morfologia da célula no mutante do gene *visP*. Os demais mutantes não apresentaram diferença significativa, sendo que a dupla mutação de certa forma resgata a morfologia da célula que é vista na cepa selvagem, ainda que com a movimentação mais lenta. Observações detalhadas neste comportamento e dinâmicas microscópica serão essenciais para elucidar estas diferenças inicialmente observadas.

## 6. Conclusões

A proteína VisP possui um papel importante para manutenção da membrana na célula e na sua virulência, e por estar presente no periplasma parece estar ligada a diversos processos celulares, como a presença do flagelo, motilidade, resposta a estresse osmótico e sistema quimiotático. Sua relação com a membrana também é notada quando a retirada de um dos genes que codificam as cadeias do antígeno-O bacteriano no *background* do mutante  $\Delta visP$  promove um desequilíbrio na produção da flagelina, que como foi visto no ensaio de motilidade parece não ser útil na movimentação flagelar. A ausência de ambos os genes *visP* e *wzzST* parece desequilibrar a montagem flagelar no que se refere aos genes de classe 3. Além do gasto energético da superprodução de FliC, a bactéria pode tornar-se mais imunogênica e até ter sua virulência comprometida, já que o sistema imunológico do hospedeiro poderia detectar com mais rapidez a flagelina devido à sua superprodução. A expressão acentuada do sensor quinase QseC também é uma característica muito importante no duplo mutante  $\Delta visP/\Delta wzzST$ , podendo ser este o fator crucial na superexpressão da flagelina FliC, maiores estudos serão necessários para sua elucidação. Desta forma este equilíbrio no funcionamento periplasmático, motilidade e cadeias do LPS parecem serem fundamentais para processos como resposta a estresse bacteriano, quimiotaxia e migração para novos nichos, todos estes essenciais passos na patogênese de *S. Typhimurium*. A compreensão da relação dos processos celulares, da membrana bacteriana e motilidade é indispensável para elucidação da patogênese microbiana.

## Referências

ALDRIDGE, P.; HUGHES, K. T. Regulation of flagellar assembly. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 160-5, Apr 2002. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11934612> >.

ALTEGOER, F.; BANGE, G. Undiscovered regions on the molecular landscape of flagellar assembly. **Curr Opin Microbiol**, v. 28, p. 98-105, Dec 2015. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26490009> >.

BAARS, L. et al. Defining the role of the Escherichia coli chaperone SecB using comparative proteomics. **J Biol Chem**, v. 281, n. 15, p. 10024-34, Apr 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16352602> >.

BARDY, S. L.; NG, S. Y.; JARRELL, K. F. Recent advances in the structure and assembly of the archaeal flagellum. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 7, n. 1-2, p. 41-51, 2004. ISSN 1464-1801. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170402> >.

BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-mediated general stress response in Escherichia coli. **Annu Rev Microbiol**, v. 65, p. 189-213, 2011. ISSN 1545-3251. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21639793> >.

BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Microb Pathog**, v. 44, n. 4, p. 271-8, Apr 2008. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17997077> >.

BISTER, B. et al. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of Salmonella enterica. **Biometals**, v. 17, n. 4, p. 471-81, Aug 2004. ISSN 0966-0844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15259369> >.

BONIFIELD, H. R.; HUGHES, K. T. Flagellar phase variation in Salmonella enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism. **J Bacteriol**, v. 185, n. 12, p. 3567-74, Jun 2003. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775694> >.

BOUGDOUR, A. et al. Multiple pathways for regulation of sigmaS (RpoS) stability in Escherichia coli via the action of multiple anti-adaptors. **Mol Microbiol**, v. 68, n. 2, p. 298-313, Apr 2008. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18383615> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.



BROWN, I. I.; HÄSE, C. C. Flagellum-independent surface migration of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 12, p. 3784-90, Jun 2001. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371543> >.

CHEVANCE, F. F.; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 6, p. 455-65, Jun 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483484> >.

CIRILLO, D. M. et al. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 1, p. 175-88, Oct 1998. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786194> >.

CLARKE, M. B. et al. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 27, p. 10420-5, Jul 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16803956> >.

DA SILVA, P. **Participação de VisP e LpxO na definição das formas de antígeno-O e na patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**. 2016. (Pós Graduação em Biociências e Biotecnologias aplicadas à farmácia). FCFar UNESP, Repositório Institucional da Unesp.

DE MAAYER, P.; COWAN, D. A. Flashy flagella: flagellin modification is relatively common and highly versatile among the Enterobacteriaceae. **BMC Genomics**, v. 17, p. 377, 2016. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27206480> >.

DELGADO, M. A.; MOUSLIM, C.; GROISMAN, E. A. The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. **Mol Microbiol**, v. 60, n. 1, p. 39-50, Apr 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556219> >.

DETWEILER, C. S. et al. *virK*, *somA* and *rscC* are important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 385-400, Apr 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675799> >.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 269-84, May 2015. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25853778> >.

FOOKES, M. et al. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *Salmonellae*. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 8, p. e1002191, Aug 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876672> >.

FRIEBEL, A. et al. SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. **J Biol Chem**, v. 276, n. 36, p. 34035-40, Sep 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440999> >.

GALÁN, J. E.; CURTISS, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 16, p. 6383-7, Aug 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548211> >.

GINALSKI, K. et al. BOF: a novel family of bacterial OB-fold proteins. **FEBS Lett**, v. 567, n. 2-3, p. 297-301, Jun 2004. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15178340> >.

GRUND, S.; WEBER, A. A new type of fimbriae on *Salmonella typhimurium*. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 35, n. 10, p. 779-82, Dec 1988. ISSN 0514-7166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2905857> >.

HACKER, J.; KAPER, J. B. **Pathogenicity islands and the evolution of pathogenic microbes**. Pathogenicity Islands and Host Adaptation of Salmonella Serovars. SPRINGER. I 2002.

HADJIFRANGISKOU, M. et al. A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 80, n. 6, p. 1516-29, Jun 2011. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21542868> >.

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. Salmonellae interplay with host cells. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 53-66, Jan 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18026123> >.

HARDT, W. D. et al. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 815-26, May 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630225> >.

HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annu Rev Microbiol**, v. 57, p. 249-73, 2003. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527279> >.

HARSHEY, R. M.; MATSUYAMA, T. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 18, p. 8631-5, Aug 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8078935> >.

HARSHEY, R. M.; PARTRIDGE, J. D. Shelter in a Swarm. **J Mol Biol**, v. 427, n. 23, p. 3683-94, Nov 2015. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26277623> >.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 373-95, table of contents, Sep 2002. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208995> >.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **Int J Med Microbiol**, v. 294, n. 2-3, p. 95-102, Sep 2004. ISSN 1438-4221. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15493819> >.

HIGASHIDE, W. et al. Involvement of SipA in modulating actin dynamics during *Salmonella* invasion into cultured epithelial cells. **Cell Microbiol**, v. 4, n. 6, p. 357-65, Jun 2002. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116966> >.

HIRSCH, M.; ELLIOTT, T. Fis regulates transcriptional induction of RpoS in *Salmonella enterica*. **J Bacteriol**, v. 187, n. 5, p. 1568-80, Mar 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716427> >.

HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. **Nature**, v. 291, n. 5812, p. 238-9, May 1981. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7015147> >.

HUMPHRIES, A.; DERIDDER, S.; BÄUMLER, A. J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial proteins serve as antigens during infection of mice. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 5329-38, Sep 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113248> >.

HÖLZER, S. U. et al. Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5458-70, Dec 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797066> >.

JUÁREZ-RODRÍGUEZ, M. D.; TORRES-ESCOBAR, A.; DEMUTH, D. R. ygiW and qseBC are co-expressed in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and regulate biofilm growth. **Microbiology**, v. 159, n. Pt 6, p. 989-1001, Jun 2013. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519160> >.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 634-44, Sep 2010. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694026> >.

KHAJANCHI, B. K. et al. The two-component QseBC signalling system regulates in vitro and in vivo virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 259-71, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998161> >.

LAI, M. A. et al. Innate immune detection of flagellin positively and negatively regulates salmonella infection. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72047, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23977202> >.

LAROCK, D. L. et al. A *Salmonella typhimurium*-translocated glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase promotes virulence by binding to the

RhoA protein switch regions. **J Biol Chem**, v. 287, n. 35, p. 29654-63, Aug 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740689> >.

LAROCK, D. L.; CHAUDHARY, A.; MILLER, S. I. Salmonellae interactions with host processes. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 191-205, Apr 2015. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749450> >.

LEE, J. et al. Identification of stress-related proteins in Escherichia coli using the pollutant cis-dichloroethylene. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 2088-102, Jun 2010. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919618> >.

LELE, P. P.; HOSU, B. G.; BERG, H. C. Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 29, p. 11839-44, Jul 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818629> >.

MARICONDA, S.; WANG, Q.; HARSHEY, R. M. A mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility. **Mol Microbiol**, v. 60, n. 6, p. 1590-602, Jun 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16796690> >.

MCGHIE, E. J.; HAYWARD, R. D.; KORONAKIS, V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive Salmonella: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. **EMBO J**, v. 20, n. 9, p. 2131-9, May 2001. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331579> >.

MERIGHI, M. et al. Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of Salmonella enterica serovar Typhimurium. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 42, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236707> >.

MIGNOT, T. et al. Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 853-6, Feb 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289998> >.

MOKRIEVICH, A. N. et al. Biological properties and structure of the lipopolysaccharide of a vaccine strain of Francisella tularensis generated by inactivation of a quorum sensing system gene qseC. **Biochemistry (Mosc)**, v. 75, n. 4, p. 443-51, Apr 2010. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618133> >.

MOREIRA, C. G. et al. Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 4, p. 1470-5, Jan 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302685> >.

MOREIRA, C. G.; SPERANDIO, V. Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenesis. **Infect Immun**, v. 80, n. 12, p. 4344-53, Dec 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027532> >.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates Salmonella enterica serovar typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 914-26, Mar 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028809> >.

NAWABI, P.; CATRON, D. M.; HALDAR, K. Esterification of cholesterol by a type III secretion effector during intracellular Salmonella infection. **Mol Microbiol**, v. 68, n. 1, p. 173-85, Apr 2008. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18333886> >.

NJOROGE, J.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic Escherichia coli virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE. **Infect Immun**, v. 80, n. 2, p. 688-703, Feb 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22144490> >.

O CRÓINÍN, T. et al. Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Mol Microbiol**, v. 62, n. 3, p. 869-82, Nov 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16999831> >.

O'BRIEN, I. G.; GIBSON, F. The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from Escherichia coli. **Biochim Biophys Acta**, v. 215, n. 2, p. 393-402, Aug 1970. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4926450> >.

OCHMAN, H. et al. Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 15, p. 7800-4, Jul 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755556> >.

OSTERMAN, I. A. et al. Regulation of Flagellar Gene Expression in Bacteria. **Biochemistry (Mosc)**, v. 80, n. 11, p. 1447-56, Nov 2015. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615435> >.

PARK, S. Y.; PONTES, M. H.; GROISMAN, E. A. Flagella-independent surface motility in Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 6, p. 1850-5, Feb 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25624475> >.

PARKINSON, J. S. Signal transduction schemes of bacteria. **Cell**, v. 73, n. 5, p. 857-71, Jun 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8098993> >.

PARTRIDGE, J. D.; HARSHEY, R. M. More than motility: Salmonella flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming. **J Bacteriol**, v. 195, n. 5, p. 919-29, Mar 2013a. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264575> >.

PARTRIDGE, J. D.; HARSHEY, R. M. Swarming: flexible roaming plans. **J Bacteriol**, v. 195, n. 5, p. 909-18, Mar 2013b. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264580> >.

PATEL, J. C.; GALÁN, J. E. Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions. **J Cell Biol**, v. 175, n. 3, p. 453-63, Nov 2006. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074883> >.

PERKINS, T. T. et al. CHIP-seq and transcriptome analysis of the OmpR regulon of Salmonella enterica serovars Typhi and Typhimurium reveals accessory genes implicated in host colonization. **Mol Microbiol**, v. 87, n. 3, p. 526-38, Feb 2013. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190111> >.

PRÜSS, B. M.; MATSUMURA, P. A regulator of the flagellar regulon of Escherichia coli, flhD, also affects cell division. **J Bacteriol**, v. 178, n. 3, p. 668-74, Feb 1996. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550498> >.

RAETZ, C. R. et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 295-329, 2007. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362200> >.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045108> >.

RAFFATELLU, M. et al. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to Salmonella enterica serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 5, p. 476-86, May 2009. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454351> >.

READING, N. C. et al. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic Escherichia coli effector involved in remodeling of host actin. **J Bacteriol**, v. 189, n. 6, p. 2468-76, Mar 2007. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220220> >.

RIETSCHEL, E. T. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J**, v. 8, n. 2, p. 217-25, Feb 1994. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119492> >.

SALAH UD-DIN, A. I.; ROUJEINIKOVA, A. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. **Cell Mol Life Sci**, Apr 2017. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28409190> >.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 1989.

SETO, S.; UENOYAMA, A.; MIYATA, M. Identification of a 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for Mycoplasma mobile

gliding. **J Bacteriol**, v. 187, n. 10, p. 3502-10, May 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866938> >.

SHEA, J. E. et al. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 6, p. 2593-7, Mar 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637919> >.

SHRIVASTAVA, A.; ROLAND, T.; BERG, H. C. The Screw-Like Movement of a Gliding Bacterium Is Powered by Spiral Motion of Cell-Surface Adhesins. **Biophys J**, v. 111, n. 5, p. 1008-13, Sep 2016. ISSN 1542-0086. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27602728> >.

SIRCILI, M. P. et al. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2329-37, Apr 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039358> >.

SOMORIN, Y. et al. The General Stress Response Is Conserved in Long-Term Soil-Persistent Strains of *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v. 82, n. 15, p. 4628-40, Aug 2016. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27235429> >.

SPERANDIO, V. et al. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8951-6, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847292> >.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Mol Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 809-21, Feb 2002. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929534> >.

STAFFORD, G. P.; OGI, T.; HUGHES, C. Binding and transcriptional activation of non-flagellar genes by the *Escherichia coli* flagellar master regulator FlhD2C2. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 6, p. 1779-88, Jun 2005. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941987> >.

STOCK, A. M.; STOCK, J. B. Purification and characterization of the CheZ protein of bacterial chemotaxis. **J Bacteriol**, v. 169, n. 7, p. 3301-11, Jul 1987. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3298217> >.

TOGUCHI, A. et al. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. **J Bacteriol**, v. 182, n. 22, p. 6308-21, Nov 2000. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053374> >.

UNAL, C. M. et al. QseC controls biofilm formation of non-typeable *Haemophilus influenzae* in addition to an AI-2-dependent mechanism. **Int J Med Microbiol**, v. 302,

n. 6, p. 261-9, Nov 2012. ISSN 1618-0607. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22954413>>.

WADHAMS, G. H.; ARMITAGE, J. P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 12, p. 1024-37, Dec 2004. ISSN 1471-0072. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573139>>.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5445-55, Oct 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988219>>.

WANG, Q. et al. Uncovering a large set of genes that affect surface motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J Bacteriol**, v. 188, n. 22, p. 7981-4, Nov 2006. ISSN 0021-9193. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16980469>>.

\_\_\_\_\_. Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. **EMBO J**, v. 24, n. 11, p. 2034-42, Jun 2005. ISSN 0261-4189. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15889148>>.

WEBER, H. et al. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. **J Bacteriol**, v. 187, n. 5, p. 1591-603, Mar 2005. ISSN 0021-9193. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716429>>.

WHO, W. H. O. **Salmonella (non-typhoidal)**. Fact Sheet n° 139 2013.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. 7th. Cambridge University Press: Cambridge University Press, 2010.

WINTER, S. E. et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**, v. 467, n. 7314, p. 426-9, Sep 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20864996>>.

WINTER, S. E. et al. The TviA auxiliary protein renders the *Salmonella enterica* serotype Typhi RcsB regulon responsive to changes in osmolarity. **Mol Microbiol**, v. 74, n. 1, p. 175-93, Oct 2009. ISSN 1365-2958. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19703107>>.

WUNDER, E. A. et al. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. **Mol Microbiol**, v. 101, n. 3, p. 457-70, Aug 2016. ISSN 1365-2958. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113476>>.

ZABURDAEV, V. et al. Uncovering the mechanism of trapping and cell orientation during *Neisseria gonorrhoeae* twitching motility. **Biophys J**, v. 107, n. 7, p. 1523-31,



Oct 2014. ISSN 1542-0086. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296304> >.

ZHAO, B.; HOURY, W. A. Acid stress response in enteropathogenic  
gammaproteobacteria: an aptitude for survival. **Biochem Cell Biol**, v. 88, n. 2, p. 301-  
14, Apr 2010. ISSN 1208-6002. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453931> >.

ZHENG, X. et al. Expression and secretion pattern of FliB of Salmonella enterica  
serovar Typhi in different culture conditions. **Microb Pathog**, v. 95, p. 142-7, Jun 2016.  
ISSN 1096-1208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27057676> >.

ZHOU, D. et al. A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other  
bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial  
internalization. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 248-59, Jan 2001. ISSN 0950-382X.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136447> >.