

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 01/03/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E

BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

**ISABELA MANCINI MARTINS**

**Caracterização genômica, transcriptômica e infecção em diferentes  
modelos de *Salmonella* Typhimurium invasiva não-tifoidal (iNTS)**

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira

Araraquara

2023

ISABELA MANCINI MARTINS

**Caracterização genômica, transcriptômica e infecção em diferentes  
modelos de *Salmonella* Typhimurium invasiva não-tifoidal (iNTS)**

Tese 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 requisito para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira

Araraquara

2023

---

**M386c** Martins, Isabela Mancini.  
Caracterização genômica, transcriptômica e infecção em diferentes modelos de *Salmonella* Typhimurium invasiva não-tifoidal (iINTS) / Isabela Mancini Martins. – Araraquara: [S.n.], 2023.  
72 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Cristiano Gallina Moreira.

1. *S. Typhimurium* ST313. 2. Testes fenotípicos relacionados à virulência. 3. Transcriptoma. 4. *Galleria mellonella*. I. Moreira, Cristiano Gallina, orient. II. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Caracterização genômica, transcriptômica e infecção em diferentes modelos de Salmonella Typhimurium invasiva não-tifoidal (iNTS)

**AUTORA: ISABELA MANCINI MARTINS**

**ORIENTADOR: CRISTIANO GALLINA MOREIRA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. JULIANA PFRIMER FALCÃO (Participação Virtual)  
Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP

Prof. Dr. RODRIGO TAVANELLI HERNANDES (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 29 de agosto de 2023

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar a vida, saúde e me proporcionar viver este momento. Sabedoria, por não me deixar desistir nas etapas mais difíceis dessa caminhada. Junto com ele, a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro que sempre esteve no meu coração e intercedendo por mim em todos os momentos.

A minha mãe Renata, que sempre foi um exemplo de mulher. Mesmo não tendo a oportunidade de estudar quando jovem, e muitas vezes dificuldades financeiras, sempre trabalhou arduamente para minha formação. Sempre fiz de tudo para que tivesse orgulho de mim, e creio que consegui. Obrigada mamãe! Agradeço ao irmão Raul, pelo amor incondicional e por ter me dado suporte em todos os momentos do doutorado.

Agradeço ao meu orientador, Cristiano Gallina Moreira por ter acreditado em mim e me orientado por todos esses anos.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana (PASIQUIBAC), pela cooperação durante toda a minha trajetória. Em especial, agradeço a minhas amigas Tamara Renata Machado e Bruna Cardinali Lustri Morgado pela paciência, ensinamentos e pela companhia em todos os momentos.

Agradeço as Técnicas Débora Pizzaia e Mariana Biasioli pelo suporte

Agradeço a minha amiga Amanda Aparecida Seribelli pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores Dra. Juliana Pfrimer Falcão, Dr. Rodrigo Hernandez e Dra. Carla Fontana pela contribuição ao meu trabalho.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP (processo nº 2019/03049-7) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## RESUMO

A compreensão dos mecanismos pelos quais as bactérias intestinais se relacionam em comunidades complexas e com o hospedeiro são essenciais para o desenvolvimento de novas terapias. Estudos anteriores do grupo revelaram mecanismos de sinalização química relacionados à patogenicidade de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium que causam predominantemente gastroenterite em humanos no mundo todo. Porém, estudos recentes têm demonstrado que linhagens ST313 de *S. Typhimurium* são capazes de evadir do Trato Gastrointestinal (TGI) e atingir a corrente sanguínea de humanos com comorbidades por via de mecanismos ainda desconhecidos. Tais linhagens são denominadas *invasive non-typhoidal Salmonella* (iNTS) e são descritas principalmente na África-subsaariana e no Brasil. O objetivo do presente trabalho foi auxiliar na compreensão da sobrevivência e colonização extra intestinal de linhagens de *S. Typhimurium* ST313. Foram utilizadas 13 linhagens de *S. Typhimurium* ST313 isoladas de hemoculturas humanas do Hospital Universitário da UNESP de Botucatu – SP entre os anos 1998-2011. O sequenciamento do genoma completo foi realizado para todas as linhagens pelo HiSeq e genes plasmidiais de virulência (pSLT) importantes para sobrevivência e multiplicação no hospedeiro e de resistência relacionados à produção de bombas de efluxo foram detectados na maioria das linhagens estudadas. Fenotipicamente foram observadas resistência apenas aos antimicrobianos estreptomocina, ampicilina e canamicina. A análise transcriptômica (RNA-seq) de uma linhagem de *S. Typhimurium* ST313 cultivada em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com sangue de carneiro a 37°C evidenciou o aumento na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico (oxidação de lipídeos) na linhagem invasiva, desempenhando um papel importante durante a infecção crônica e colonização tecidual. O gene *fadA* é necessário para oxidação do ácido graxo e o gene *citX* no metabolismo e transporte lipídico, ambos apresentaram aumento de expressão e até o dado momento essa via ainda não foi explorada em ST313. Foram realizados nocautes gênicos via Lambda Red para caracterização fenotípica e ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar a patogênese de *S. Typhimurium* ST313. A interrupção dos genes alvos *fadA* e *citX* resultaram na diminuição da invasão em células HeLa e diminuição da replicação/sobrevivências em macrófagos J774. No ensaio *in vivo* no modelo alternativo de *Galleria mellonella* a porcentagem de larvas sobreviventes é superior as larvas inoculadas com linhagens mutantes durante o período de 72 horas, evidenciando a atenuação da virulência de *S. Typhimurium* ST313 em genes correlacionados ao metabolismo lipídico, também foi visualizado na análise histopatológica atenuação das lesões no tecido intestinal dos mutantes em comparação a linhagem selvagem. Portanto, os resultados obtidos até o momento contribuem para uma melhor caracterização da virulência deste tipo clonal e entendimento deste importante patógeno em nosso meio.

**Palavras-chave:** *S. Typhimurium* ST313, testes fenotípicos relacionados à virulência, transcriptoma, *Galleria mellonella*.

## ABSTRACT

Understanding the mechanisms by which intestinal bacteria interact in complex communities and with the host is essential for the development of new therapies. Previous studies by the group revealed chemical signaling mechanisms related to the pathogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium that predominantly cause gastroenteritis in humans worldwide. However, recent studies have demonstrated that ST313 strains of *S. Typhimurium* are able to evade the Gastrointestinal Tract (GT) and reach the bloodstream of humans with comorbidities through mechanisms still unknown. These strains are known as invasive non-typhoidal *Salmonella* (iNTS) and are mainly described in sub-Saharan Africa and Brazil. The aim of the study was to help in understanding the survival and extra intestinal colonization of *S. Typhimurium* ST313 strains. We used 13 strains of *S. Typhimurium* ST313 isolated from human blood cultures at the University Hospital of UNESP in Botucatu – SP between the years 1998-2011. Whole genome sequencing was performed for all strains by HiSeq and plasmid virulence (pSLT) important for survival and multiplication in the host and resistance genes related to efflux pump production were detected in most of the strains studied. Phenotypically, resistance was observed only to the antimicrobials streptomycin, ampicillin and kanamycin. Transcriptomic analysis (RNA-seq) of a strain of *S. Typhimurium* ST313 grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with sheep blood at 37°C showed an increase in the expression of genes related to lipid metabolism (lipid oxidation) in the invasive strain, playing an important role during chronic infection and tissue colonization. The *fadA* gene is necessary for fatty acid oxidation and the *citX* gene for lipid metabolism and transport, both showed increased expression and so far this pathway has not been explored in ST313. Gene knockouts were generated via Lambda Red, and it was used to perform phenotypic characterization and *in vivo* and *in vitro* assays to evaluate the pathogenesis of *S. Typhimurium* ST313. Disruption of *fadA* and *citX* target genes resulted in decreased invasion in HeLa cells and decreased replication/survival in J774 macrophages. In the *in vivo* assay in the alternative model of *Galleria mellonella*, the percentage of surviving larvae is higher in larvae inoculated with mutant strains during the 72 hours period, evidencing the attenuation of virulence of *S. Typhimurium* ST313 in genes correlated to lipid metabolism, was also visualized in the histopathological analysis attenuation of the lesions in the intestinal tissue of the mutants in comparison to the wild lineage. Therefore, the results obtained so far contribute to a better characterization of the virulence of this clonal type and understanding of this important pathogen in our environment.

**Key words:** *S. Typhimurium* ST313, phenotypic tests related to virulence, transcriptomic analysis, *Galleria mellonella*.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de vias de metabolismo lipídico em <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	16
<b>Figura 2.</b> Estratégia de nocaute via Lambda Red.....	25
<b>Figura 3.</b> Volcano plot da expressão relativa entre <i>S. Typhimurium</i> ST313 em comparação ao LB suplementado com sangue e LB. Distribuição dos genes de ST313 de acordo com o logFC e <i>p-value</i> . Pontos em azul representam os genes que não tiveram sua expressão alterada; pontos em vermelho representam genes com expressão diferencial. ....	32
<b>Figura 4.</b> Análise Transcriptômica das principais vias de <i>S. Typhimurium</i> ST313 após o crescimento em LB suplementado com 5% de sangue de carneiro em comparação ao LB a 37°C .....	33
<b>Figura 5.</b> qRT-PCR dos alvos <i>fadA</i> e <i>citX</i> .....	34
<b>Figura 6.</b> Checagem da mutagênese via PCR dos alvos <i>fadA</i> e <i>citX</i> .....	35
<b>Figura 7.</b> Curva de crescimento em meio Luria-Bertani.....	36
<b>Figura 8.</b> Curva de crescimento em meio M9 .....	36
<b>Figura 9.</b> Curva de crescimento em M9 suplementado com glicose.....	37
<b>Figura 10.</b> Curva de crescimento em M9 suplementado com ácido oleico.....	37
<b>Figura 11.</b> Ensaio de invasão em células HeLa. ....	38
<b>Figura 12.</b> Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM.....	39
<b>Figura 13.</b> Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM com glicose.....	39
<b>Figura 14.</b> Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM com ácido oleico..	40
<b>Figura 15.</b> <i>Galleria mellonella</i> .....	41
<b>Figura 16.</b> Análise histopatológica do intestino de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. Typhimurium</i> SL1344 (ST19).....	42
<b>Figura 17.</b> Análise histopatológica do intestino de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. Typhimurium</i> ST313 selvagem.....	43
<b>Figura 18.</b> Análise histopatológica do intestino de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. Typhimurium</i> ST313 mutante <i>fadA</i> .....	43
<b>Figura 19.</b> Análise histopatológica do intestino de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. Typhimurium</i> ST313 mutante <i>citX</i> .....	44

**Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Identificação e ano de isolamento das 13 linhagens de <i>S. Typhimurium</i> ST313 provenientes de hemoculturas humanas utilizadas no estudo.....	20
<b>Tabela 2.</b> Primers utilizados na técnica de qRT-PCR.....	23
<b>Tabela 3.</b> Primers utilizados na mutagênese.....	25
<b>Tabela 4.</b> Primers utilizados na checagem da mutagênese.....	25
<b>Tabela 5.</b> Perfis de resistência genotípica e fenotípica das 13 linhagens de <i>S. Typhimurium</i> ST313 estudadas.....	29
<b>Tabela 6.</b> Características de genes plasmidiais das 13 <i>S. Typhimurium</i> ST313 provenientes de sangue humano através do <i>Virulence Factors Database</i> (VFDB) .....	30

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
D.O. <sub>600</sub>	Densidade Óptica a 600 nanômetros
GO	<i>Gene Ontology</i>
H&E	Hematoxilina e Eosina
iNTS	<i>invasive non-typhoidal Salmonella</i>
LB	Luria-Bertani
MOI	Multiplicity of infection
NARMS	<i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SPI	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>
ST	Sequence Type
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
TGI	Trato Gastrointestinal
T3SS	Sistema de Secreção do Tipo 3
VFDB	<i>Virulence Factors Database</i>
$\Delta\Delta Ct$	<i>Comparative Critical Threshold</i>
WT	<i>Wild Type</i>
ZEO	Zeomicina

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Patogênese de <i>Salmonella</i> : SPI-1 e SPI-2.....	14
1.2 Metabolismo .....	15
1.3 Modelo alternativo para estudos de patogenicidade .....	17
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO .....	18
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1. Sequenciamento de genoma completo .....	20
4.2. Plasmídeo de virulência e genes de resistência.....	21
4.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de linhagens ST313 .....	21
4.4. Extração de RNA para análise da expressão gênica .....	22
4.5. Mapeamento de bibliotecas de RNAseq e análise da expressão diferencial de genes.....	22
4.6. Análise de ontologia gênica .....	23
4.7. Análise de expressão por qRT-PCR.....	23
4.8. Construção de mutantes isogênicos .....	23
4.9. Curva de crescimento.....	25
4.10. Ensaio de invasão em células HeLa .....	26
4.11. Ensaio de replicação em macrófagos .....	26
4.12. Virulência no modelo alternativo <i>Galleria mellonella</i> .....	27
4.13. Análise histopatológica do modelo alternativo <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>S. Typhimurium</i> .....	27
4.14. Análise Estatística .....	28
5. RESULTADOS .....	29
5.1. Análise de genes resistência.....	29
5.2. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana .....	30
5.3. Pesquisa de genes do plasmídeo de virulência pSLT .....	30
5.4. Análise Transcriptômica .....	31
5.4.1. Análise transcriptômica de <i>S. Typhimurium</i> ST313 após o crescimento em LB suplementado com sangue versus LB.....	31
5.5. Análise da expressão gênica via qRT-PCR.....	33

5.6. Checagem da mutagênese via PCR.....	34
5.7. Curva de crescimento em meios diferenciais.....	35
5.8. Ensaio de invasão de células HeLa .....	38
5.9. Ensaio de replicação em macrófagos .....	38
5.10. Mutantes de <i>S. Typhimurium</i> ST313 possuem atenuação da virulência em modelo de <i>Galleria mellonella</i> .....	40
5.11. Análises histopatológicas de <i>G. mellonella</i> apresentam diferenças na preservação do tecido intestinal entre linhagem selvagem e mutantes de <i>Salmonella</i> Typhimurium ST313.....	41
7 CONCLUSÕES .....	53
REFERÊNCIAS .....	54
APÊNDICE 1 .....	68
APÊNDICE 2 .....	69
APÊNDICE 3 .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias necessitam de mecanismos específicos para a comunicação intercelular, desta forma a sinalização química em bactérias é um dos mais intrigantes aspectos da relação entre estes microrganismos (HUGHES *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2010). Assim como, a relação patógeno-hospedeiro e sua respectiva microbiota que empregam diversos mecanismos para se comunicar com o meio e regular seus mecanismos de sobrevivência (HUGHES *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2010). Especificamente, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* tem sido considerada um dos principais patógenos intestinais de origem alimentar no planeta, sendo subdivididas em dois grupos de acordo com as doenças associadas: *Salmonella* tifoideais e não tifoideais. As febres tifoide e paratifoide são causadas pelos sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, respectivamente e a infecção se desenvolve inicialmente na mucosa intestinal e evolui para uma doença sistêmica (FERREIRA; CAMPOS, 2008; HARAGA *et al.*, 2008).

*Salmonella* não tifoide ou do inglês *non-typhoidal Salmonella* (NTS) tem sido uma importante causa de gastroenterite autolimitante no mundo, sendo que apenas uma minoria dos casos (~5%) desenvolve a doença invasiva, frequentemente devido a imunossupressão, por exemplo, na infecção avançada pelo HIV (ASHTON *et al.*, 2017). É importante mencionar que muitos sorovares de NTS descritos como hospedeiros generalistas, incluindo *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são capazes de infectar animais e humanos (HARAGA *et al.*, 2008). Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (2021), estima-se que aproximadamente 1,2 milhões de pessoas são acometidas por gastroenterites ocasionadas por *Salmonella* resultando em 450 óbitos anualmente nos Estados Unidos (CDC, 2021).

O *Sequence Type* (ST) 19 é o mais prevalente e estudado ST entre as linhagens de *S. Typhimurium* seguidas por ST34 e ST313 (ACHTMAN *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2017). O ST é obtido pela técnica de *Multilocus sequence typing* (MLST) que consiste em uma abordagem molecular de anotação de microrganismos e utiliza a variação alélica de genes altamente conservados em *Salmonella* (ACHTMAN *et al.*, 2012). Dados clínicos e epidemiológicos indicaram que *S. Typhimurium* ST313 tem sido intimamente ligada à doença invasiva sistêmica como bacteremia, septicemia e meningite. As altas taxas de resistência antimicrobiana e uma mortalidade superior a 25% são frequentemente observadas no continente Africano (FEASEY *et al.*, 2014; LEY *et al.*, 2014; RAMACHANDRAN *et al.*, 2015).

Casos de gastroenterite têm sido causados predominantemente por *S. Typhimurium* ST19 no mundo todo, principalmente no Malawi, Mali, Quênia, Nigéria entre outros (RAMACHANDRAN *et al.*, 2015). No intestino delgado, *S. Typhimurium* atravessa a mucosa intestinal a fim de escapar das enzimas digestivas, sais biliares, peptídeos antimicrobianos, IgA secretada e defesa imunológica inata do hospedeiro. A interação com as células do hospedeiro culmina em reorganização dos filamentos de actina e facilita a internalização via macropinocitose (HARAGA *et al.*, 2008; NEEDHAM; TRENT, 2013).

Sabe-se que *invasive non-typhoidal Salmonella* (iNTS) tem sido um grave problema de saúde pública, principalmente porque causa uma alta taxa de mortalidade em pacientes com comorbidades como HIV, malária, desnutrição, caquexia e anemia falciforme na África. Além disso, muitas dessas linhagens são multidroga resistentes (resistente a três ou mais classes de antimicrobianos diferentes) gerando um cenário preocupante no continente (SINGLETARY *et al.*, 2016; HASELBECK *et al.*, 2017).

Plasmídeos são conhecidos por serem essenciais para a virulência e resistência a antimicrobianos em diferentes bactérias, o grupo de incompatibilidade de plasmídeos IncF é heterogêneo e constantemente descrito em enterobactérias (VILLA *et al.*, 2010; SERIBELLI *et al.*, 2020). O plasmídeo de virulência de *S. Typhimurium* (pSLT) pertence ao grupo de incompatibilidade de plasmídeo IncFIII e carrega genes importantes para a patogenicidade desse sorovar. Especificamente, neste plasmídeo há uma região altamente conservada denominada *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) que codifica quatro genes estruturais *spvA*, *spvB*, *spvC* e *spvD* e o gene regulatório *spvR* (GUINEY *et al.*, 1995; GILCHRIST; MACLENNAN, 2019). Ademais, os genes *spvB* e *spvC* são efetores da Ilha de Patogenicidade de *Salmonella 2* participando no processo de apoptose de macrófagos e diminuindo a resposta inflamatória do hospedeiro, respectivamente (IBARRA; STEELE-MORTIMER, 2009; HEIJDEN; FINLAY, 2012).

*S. Typhimurium* ST313 são normalmente isoladas do sangue humano e consideradas mais invasivas por sua capacidade de evadir do Trato Gastrointestinal (TGI) e atingir a corrente sanguínea por mecanismos ainda desconhecidos (SINGLETARY *et al.*, 2016). No Malawi verificou-se a alta prevalência de *S. Typhimurium* ST313 em uma coleção de isolados datada de 1997 a 2006, todas as 31 amostras foram positivas para ST313, sendo 87% provenientes do sangue e 13% do líquido cefalorraquidiano, no Quênia 13/20 amostras foram positivas para ST313 sendo 84,7% isolados do sangue (KINGSLEY *et al.*, 2009). Porém, existe ainda muitas dúvidas em como esta iNTS consegue alcançar e sobreviver na corrente sanguínea.

Estudos baseados no sequenciamento do genoma, confirmaram linhagens filogenéticas distintas de ST313, linhagem 1 (L1) foi identificada por volta de 1960 no sudoeste da África e a L2 (D23580) no Malawi em 1977 (OKORO *et al.*, 2012). Análise da sequência completa do genoma de *S. Typhimurium* D23580 sugere que o ST313 pode ter sofrido degradação seletiva parcial do genoma propiciando algumas semelhanças com os sorovares de *Salmonella* adaptados ao hospedeiro que causam doenças invasivas, como *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e *S. Gallinarum* (KINGSLEY *et al.*, 2009). A linhagem D23580 apresenta resistência ao cloranfenicol, no qual era o tratamento de primeira linha para infecções sépticas no Malawi em 2001 (OKORO *et al.*, 2012; TSAI; COOMBES, 2021). Posteriormente, adquiriu-se resistência a ampicilina, canamicina, estreptomicina, sulfonamidas e trimetropim (KINGSLEY *et al.*, 2009; SINGLETARY *et al.*, 2016).

Recentemente denominaram-se em L3 as variantes susceptíveis a antimicrobianos e clonalmente relacionadas às ST313 isoladas predominantemente em casos de gastroenterite encontrados no Reino Unido e Brasil (ASHTON *et al.*, 2017; PULFORD *et al.*, 2020; PEREZ-SEPULVEDA *et al.*, 2021). No Brasil isolou-se *S. Typhimurium* ST313 de várias fontes como alimentos, fezes e sangue humano (ALMEIDA *et al.*, 2017; SERIBELLI *et al.*, 2021a). Um estudo recente demonstrou que *S. Typhimurium* ST313 isolada de fezes humana estabeleceu melhor colonização e invasão no cólon murino e maior expressão de genes relacionados à patogênese em comparação com a linhagem *S. Typhimurium* SL1344 (SERIBELLI *et al.*, 2021b).

### **1.1 Patogênese de *Salmonella*: SPI-1 e SPI-2**

A patogênese de *S. Typhimurium* é um mecanismo complexo e orquestrado (HARAGA *et al.*, 2008). Diversas ilhas de patogenicidade têm sido descritas na literatura e as mais bem elucidadas a partir do sequenciamento das linhagens *S. Typhimurium* LT2 e ST19 (SL1344) são as ilhas que classicamente estão associadas a processos infecciosos denominadas Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* 1 e 2 (SPI-1 e SPI-2) (GALAN; CURTISS, 1989; OCHMAN *et al.*, 1996; MARCUS *et al.*, 2000; KRÖGER *et al.*, 2012). As ilhas SPI-1 e SPI-2 codificam distintos Sistemas de Secreção do Tipo 3 (T3SS), estruturas em forma de agulha molecular responsáveis por injetar proteínas efetoras essenciais durante dois momentos distintos, extra e intracelular (GROISMAN; OCHMAN, 1993; SHEA *et al.*, 1996; HENSEL *et al.*, 1998).

A SPI-1 está associada à invasão celular e contém genes que codificam proteínas efetoras, como reguladores do SPI1-T3SS. Entre tais proteínas, estão três importantes efetores (SopE, SopE2 e SopB) para o patógeno e outros três como as RhoGTPases, Cdc42,

Rac1 e RhoG para o hospedeiro. Estas proteínas são requeridas para a coordenação e eficiência do processo de invasão, de modo que alteram a reorganização dos filamentos de actina, facilitando o processo de internalização bacteriana por macropinocitose (GALAN & CURTISS, 1989; GROISMAN; OCHMAN, 1993; GALAN, 1996; MCGHIE *et al.*, 2001). Após a secreção de efetores e a internalização de *Salmonella*, ocorre a formação do vacúolo (*Salmonella-containing vacuole* – SCV). Uma vez dentro da célula hospedeira, *Salmonella* consegue evitar a ação de células imunológicas no lúmen intestinal, protegendo-se de citocinas secretadas durante a inflamação (HERRERO-FRESNO; OLSEN, 2017).

Os genes de virulência localizados em SPI-2 estão relacionados à replicação intracelular, sobrevivência em macrófagos e infecção sistêmica em camundongos (SRIKANTH *et al.*, 2011). A proteína SsrB liga-se a todos os promotores da SPI-2 de agrupamentos de genes essenciais para a expressão estrutural, reguladora e de componentes efetores deste *locus* (SRIKANTH *et al.*, 2011). Apesar de ser codificada fora de SPI-2, a proteína efetora SifA é secretada via o aparato T3SS codificado por SPI-2, sendo que esta é crucial na indução da tubulação do fagossomo de *S. Typhimurium* (GROISMAN; OCHMAN, 1993; SHEA *et al.*, 1999).

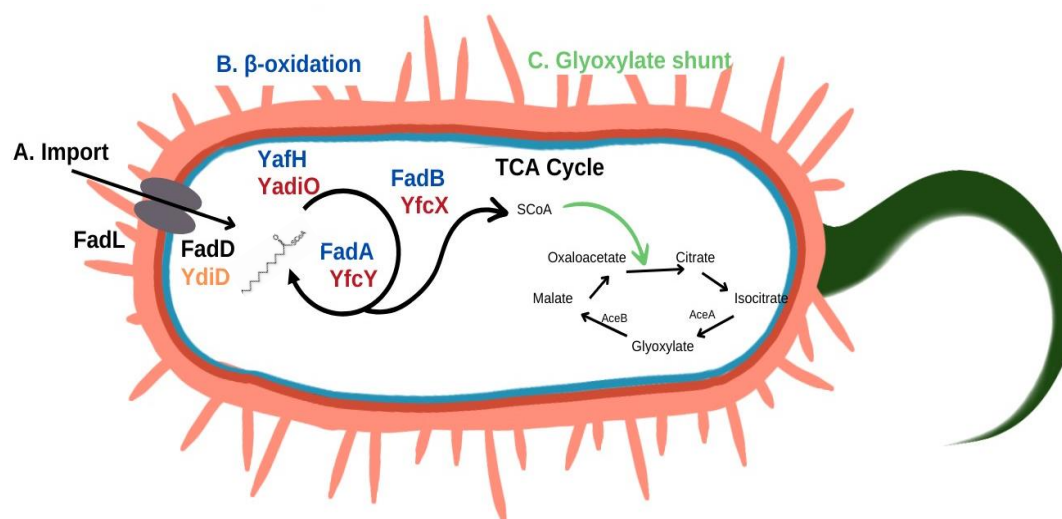
## 1.2 Metabolismo

Bactérias podem causar doenças em diversos hospedeiros e quanto mais nos aprofundamos na dinâmica do funcionamento destes microrganismos observamos que algo distinto ocorre em cada situação, podendo isso ser devido a fatores externos ao microrganismo ou a sua capacidade de adaptação aos diferentes hospedeiros (LUSTRI *et al.*, 2017). *Salmonella Typhimurium* possui um metabolismo energético diversificado para colonizar novos nichos infecciosos, ativando rotas metabólicas, a fim de sobreviver a ambientes diferenciados (TAYLOR; WINTER, 2020).

Há habilidade de utilizar ácidos graxos e o desvio de glioxilato parece desempenhar um papel crítico em *Salmonella* durante a infecção crônica em hospedeiros mamíferos (FANG *et al.*, 2005; HERRERO-FRESNO; OLSEN, 2017). A degradação do ácido graxo por *S. Typhimurium* envolve múltiplos passos (**Figura 1**), alguns dos quais podem ser executados por produtos genéticos codificados por uma via de metabolismo lipídico canônico ou secundário (CLARK; CRONAN, 2005; IRAM; CRONAN, 2006). Os ácidos graxos de cadeia média e longa são transportados através da membrana externa por FadL e FadD e ativados pela adição de coenzima A (CoA) para produzir acil-CoA (REENS *et al.*, 2020).

Na segunda etapa do metabolismo lipídico, o acil-CoA é oxidado por uma série de enzimas para produzir acetil-CoA, participando no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (IRAM; CRONAN, 2006; REEN S *et al.*, 2019) (**Figura 1**).

**Figura 1.** Esquema de vias de metabolismo lipídico em *Salmonella Typhimurium*



**Fonte:** Adaptado de Reens (REENS *et al.*, 2020).

Figura 1. Esquema de vias de metabolismo lipídico em *S. Typhimurium*. (A) Os ácidos graxos livres de cadeia longa e média são importados via FadL e ativados por FadD ou YdiD (sínteses de acil-CoA). As proteínas de importação canônica são negras; a importação secundária é laranja. (B) Os acil-tioesters resultantes são serialmente  $\beta$ -oxidados via YafH ou YdiO, FadB ou YfcX e FadA ou YfcY. O produto é metabolizado através do ciclo TCA. A  $\beta$ -oxidação canônicos são azuis e a  $\beta$ -oxidação secundária em vermelho. (C) O desvio do glicoxilato (verde) consiste em AceA (isocitrato liase) e AceB (malato sintase), que fazem a ponte do ciclo TCA.

*Salmonella Typhimurium* é capaz de utilizar tanto os caminhos canônicos (YafH, FadB e FadA) ou secundário (YdiO, YfcX e YfcY) da  $\beta$ -oxidação (oxidação de ácidos graxos). Em condições anaeróbias *S. Typhimurium* utiliza o caminho secundário e em condições aeróbias depende em grande parte da via canônica (REENS *et al.*, 2020).

Quando os lipídeos são a única fonte de carbono para *S. Typhimurium* o desvio do glicoxilato se faz necessário para preservá-lo e incorporar em vias biosintéticas. No terceiro passo do metabolismo lipídico do TCA, o acetil-CoA é convertido em citrato e posteriormente em isocitrato. Nessa etapa as enzimas AceA (isocitrato liase) e AceB (malato sintase) fazem o desvio e convertem isocitrato em glicoxilato, preservando o carbono e cofatores durante o crescimento na ausência de fontes de energia glicolíticas (FANG *et al.*, 2005; YIMGA *et al.*, 2006; REENS *et al.*, 2020; TAYLOR; WINTER, 2020).

### 1.3 Modelo alternativo para estudos de patogenicidade

Nos últimos anos, sabe-se que a prática científica tem buscado a utilização de modelos alternativos de infecção, como uma ferramenta para minimizar o uso de animais em pesquisa. *Galleria mellonella* é a maior mariposa da cera de abelhas e tem sido amplamente utilizada como hospedeiro modelo, devido a presença de uma resposta imune inata com alto grau de homologia com o sistema mamífero, os hemócitos presente na hemolinfa comportam-se de forma similar às células fagocíticas apresentando robusta explosão oxidativa em resposta a alvos microbianos (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009; BENDER *et al.*, 2013; VIEGAS *et al.*, 2013). Além disso, em contraste com outros modelos invertebrados, experimentos com larvas de *G. mellonella* podem ser realizados a 37°C, temperatura ideal para a grande maioria dos patógenos humanos (BENDER *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram a correlação positiva em dados obtidos nos ensaios de virulência no modelo de camundongos infectados por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* em comparação aos achados em larvas de *G. mellonella* (BRENNAN *et al.*, 2002; SLATER *et al.*, 2011). Ademais, o modelo alternativo de *G. mellonella* também foi empregado para avaliar a virulência de *Paracoccidioides* spp. (SCORZONI *et al.*, 2015) e patógenos bacterianos, incluindo *Staphylococcus aureus* (GROUNTA *et al.*, 2016), *Serratia marcescens* (CHADWICK *et al.*, 1990), *Pseudomonas aeruginosa* (JANDER *et al.*, 2000), *Listeria monocytogenes* (MUKHERJEE *et al.*, 2010), *Enterococcus faecalis* (LEBRETON *et al.*, 2011) e *S. Typhimurium* (BENDER *et al.*, 2013; SERIBELLI *et al.*, 2020). Outras vantagens de utilizar *G. mellonella* como modelo de infecção é a capacidade de aplicar doses bacterianas definidas através da hemocele e são facilmente cultivadas em grande número a baixo custo (BENDER *et al.*, 2013).

## 7 CONCLUSÕES

Este estudo analisou características fenotípicas, genotípicas e transcriptômicas de linhagens de *S. Typhimurium* ST313 provenientes de hemoculturas humanas no Estado de São Paulo. As linhagens desse ST brasileiro não demonstram a resistência encontrada na África por outro lado observou-se a resistência ao antimicrobiano comumente utilizado na prática veterinária.

Visivelmente, demonstramos aqui que mutantes do metabolismo lipídico são importantes para a patogênese da linhagem de *S. Typhimurium* ST313 evidenciado nos testes realizados, incluindo a invasão em células HeLa, sobrevivência em macrófagos J774 e infecção no modelo alternativo de *G. mellonella*.

De maneira geral, os resultados do presente trabalho contribuíram para um melhor entendimento dessas linhagens invasivas, as quais apresentam um grave problema de saúde pública no continente Africano.

## REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M.; WAIN, J.; WEILL, F.X.; NAIR, S. *et al.* Multi locus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS Pathog**, v.8, p1-19, 2012.

ALMEIDA, F.; SERIBELLI, A.A.; SILVA, P.; MEDEIROS, M.I.C. *et al.* Multi locus sequence typing of *Salmonella* Typhimurium reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. **Infect Genet Evol**, v.51, p.41-44, 2017.

ALMEIDA, F.; SERIBELLI, A.A.; MEDEIROS, M.I.C.; RODRIGUES, D.P. *et al.* Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. **PLoS One**, v.13, p.e0201882, 2018.

ANDERS, S.; PYL, P.T.; HUBER, W. HTSeq—a Python frame-work to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v.31, p.166–169, 2015.

ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high through-put sequence data. 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

ASHTON, P.M.; OWEN, S.V.; KAINDAMA, L.; ROWE, W.P.M.; LANE, C.R. *et al.* Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella* Typhimurium epidemic in Africa. **Med genoma**, v.9, p1-13, 2017.

BADIA, J.; ROS, J.; AGUILAR, J. Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella* Typhimurium and *Klebsiella pneumoniae*. **J Bacteriol**, v.1, p.435–437, 1985.

BAKKEREN, E.; HUISMAN, J.S.; FATTINGER, S.A. *et al.* *Salmonella* persists promote the spread of antibiotic resistance plasmids in the gut. **Nature**, v.573, p.276–280, 2019.

BARUZZO, G.; HAYER, K.E.; KIM, E.J.; CAMILLO, B.D. *et al.* Simulation-based comprehensive bench-marking of RNA-seq aligners. **Nat Methods**, v.14, p.135–139, 2017.

BENDER, J.K.; WILLE, T.; BLANK, K.; LANGE, A. *et al.* LPS Structure and PhoQ activity are important for *Salmonella* Typhimurium virulence in the *Galleria mellonella* infection model. **PLoS One**, 8, p.e73287, 2013.

BOETZER, M.; HENKEL, C.V.; JANSEN, H.J., BUTLER, D. et al. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. **Bioinformatics**, v.27, p.578-579, 2011.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**. v.30, p.2114– 2120, 2014.

BOSI, E.; DONATI, B.; GALARDINI, M.; BRUNETTI, S. et al. MeDuSa: a multi-draft based scaffold. **Bioinformatics**, v.31, p.2443-2451, 2015.

BUCKLEY, A.M.; WEBBER, M.A.; COOLES, S. et al. The AcrAB–TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. **Cell Microbiol**, v.8, p.847-856, 2006.

CAMPIONI, F.; ZOLDAN, M.; FALCÃO, J.P. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. **Epidemiol Infect**, p.1-8, 2014.

CANALS, R.; HAMMARLÖF, D.L.; KRÖGER, C.; OWEN, S.V. et al. Adding function to the genome of African *Salmonella* Typhimurium ST313 strain D23580. **PLoS Biol**, v.17, p. e3000059, 2019.

CARATTOLI, A.; ZANKARI, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; LARSEN, M.V. et al. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p.3895–3903, 2014.

CARDEN, S; OKORO, C; GORDON, D., MONACK, D. Non-Typhoidal *Salmonella* Typhimurium ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis. **Pathog Dis**, v. 73, 2015.

CHADWICK, J.S.; CALDWELL, S.S.; CHADWICK, P. Adherence patterns and virulence for *Galleria mellonella* larvae of isolates of *Serratia marcescens*. **J. Invertebr Pathol**, v.55, p.133-134, 1990.

CHEN, L.; YANG, J.; YU, J.; YAO, Z. et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 325–328, 2005.

CLARK, D.; CRONAN, J. Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. **Eco Sal Plus**, v.1, p.1-34, 2005.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Salmonella*. 2021 [Cited 2021 Aug 25]. Available from: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

COIL, D.; JOSPIN, G.; DARLING, A.E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. **Bioinformatics**, v.31, p.587-589, 2015.

CONCEIÇÃO, R.C.S.; STURBELLE, R.T.; TIMM, C.D.; LEITE, F.P.L. Inducers and autoinducers on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium motility, growth and gene expression. **Ciencia Rural**, v.45, p.1-6, 2015.

DATSENKO, K.A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, p.6640- 6645, 2000.

DENG, W.; MARSHALL, N.; ROWLAND, J.; MCCOY, J.M. et al. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, p. 323–337, 2017.

EISELE, N.A.; RUBY, T.; JACOBSON, A., MANZANILLO, P.S. et al. *Salmonella* require the fatty acid regulator PPAR for the establishment of a metabolic environment essential for long-term persistence. **Cell Host Microbe**, v.14, p.171–18, 2013.

EWALD, J.C.; REICH, S.; BAUMANN, S.; FROMMER, W.B. et al. Engineering genetically encoded nano sensors for Real-Time *in vivo* measurements of citrate concentrations. **PLoS One**, v.6, p.e28245, 2011.

FABER, F.; THIENNIMITR, P.; SPIGA, L.; BYNDLOSS, M.X. et al. Respiration of microbiota-derived 1,2-propanediol drives *Salmonella* expansion during colitis. **PLoS Pathog**, v.13, p.e1006129, 2017.

FÀBREGA, A; VILA, J. *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clin Microbiol Rev**, v.26, p.308-41, 2013.

FANG, F.C.; LIBBY, S.J.; CASTOR, M.E.; FUNG, A.M. Isocitrate lyase (AceA) is required for *Salmonella* persistence but not for acute lethal infection in mice. **Infect Immun**, v.73, p.2547-2549, 2005.

FEASEY, N.A.; CAIN, A.K.; MSEFULA, C.L., PICKARD, D. et al. Drug resistance in *Salmonella enterica* ser. Typhimurium bloodstream infection, Malawi. **Emerg Infect Dis**, v.20, 1957-1959, 2014.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5 ed. São Paulo: Atheneu, Cap. 43, p.329-338, 2008.

FIERER, J.; ECKMANN, L.; FANG, F.; PFEIFER, C. et al. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophages and nonphagocytic cells. **Infect Immun**, v.61, p.5231-5236, 1993.

FINLAY, B.B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. **J Cell Sci**, v.99, Pt 2, p.283-296, 1991.

GALAN, J.E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. **Mol Microbiol**, v.20, p.263-271, 1996.

GALAN, J.E.; CURTISS, R. 3rd. 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, p.6383-6387, 1989.

GILCHRIST, J.J.; MACLENNAN, C.A. Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease in Africa. **EcoSal Plus**, v. 8, p.1-23, 2019.

GUINEY, D.G.; FANG, F.C.; KRAUSE, M.; LIBBY, S. et al. Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. **Clin Infect Dis**, v.21 Suppl 2, p. S146-151, 1995.

GRAM, A.M.; WRIGHT, J.A.; PICKERING, R.J.; LAM, N.L. et al. *Salmonella* flagellin activates NAIP/NLRC4 and canonical NLRP3 inflammasomes in human macrophages. **J Immunol**. v.1, p.631-640, 2020.

GROISMAN, E.A.; OCHMAN, H. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri*. **EMBOJ**, v.12, p.3779-3787, 1993.

GROUNTA, A.; HARIZANIS, P.; MYLONAKIS, E.; NYCHAS, G.J. et al. Investigating the effect of different treatments with lactic acid bacteria on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* infection in *Galleria mellonella* larvae. **PLoS One**, 11:e0161263, 2016.

HASELBECK, A.H.; PANZNER, U.; IM, J.; BAKER, S. et al. Current perspectives on invasive nontyphoidal *Salmonella* disease. **Curr Opin Infect Dis**. v.30, 498-503, 2017.

HARAGA, A.; OHLSON, M.B.; MILLER, S.I. *Salmonellae* interplay with host cells. **Nat Rev Microbiol**, v.6, p.53-66, 2008.

HEIJDEN, J.; FINLAY, B. B. Type III effector-mediated processes in *Salmonella* infection. **Future Microbiol**, v.7, p. 685-703, 2012.

HENSEL, M.; SHEA, J.E.; WATERMAN, S.R.; MUNDY. R. et al. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. **Mol Microbiol**, v.30, p.163-174, 1998.

HERNANDES, R.T.; DE LA CRUZ, M.A.; YAMAMOTO, D.; GIRÓN, J.A.; GOMES, T.A. Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect Immun**, v.81, p.3793-3802, 2013.

HERRERO-FRESNO, A.; OLSEN, J.E. *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host– A mini-review. **Food Microbiology**, v.71, p.98-100, 2017.

HUGHES, D.T.; TEREKHOVA, D.A.; LIOU L, HOVDE, C.J. et al. Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, p.9831-9836, 2010.

IBARRA, J. A.; STEELE-MORTIMER, O. *Salmonella*- the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. **Cell Microbiol**, v. 11, p. 1579-1586, 2009.

IRAM, S.H.; CRONAN, J.E. The  $\beta$ -oxidation systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are not functionally equivalent. **J Bacteriol**, v.188, p.599-608, 2006.

IWAMA, T.; ITO, Y.; AOKI, H.; SAKAMOTO, H. et al. Differential recognition of citrate and a metal-citrate complex by the bacterial chemoreceptor Tcp. **J Biol Chem**, v.281, p.17727-17735, 2006.

JANDER, G.; RAHME, L.G.; AUSUBEL, F.M. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. **J Bacteriol**, v.182, 3843-3845, 2000.

KINGSLEY, R.A.; MSEFULA, C.L.; THOMSON, N.R.; KARIUKI, S. et al. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. **Genome Res**, v.19, n.12, p.2279-2287, 2009.

KNODLER, L.A.; NAIR, V.; STEELE-MORTIMER, O. Quantitative assessment of cytosolic *Salmonella* in epithelial cells. **PLoS ONE**, v.9, E84681, 2014.

KRÖGER, C.; DILLON, S.C.; CAMERON, A.D.S.; PAPENFORT, K. et al. The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.25, p.1277–1286, 2012.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, v.9, 357–359, 2012.

LANGRIDGE, G.C.; FOOKES, M.; CONNOR, T.R.; FELTWELL, T. et al. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.112, p.863–868, 2015.

LEBRETON, F.; LEBRAS, F.; REFFUVEILLE, F.; LADJOUZI, R. et al. *Galleria mellonella* as a model for studying *Enterococcus faecium* host persistence. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.21, p.191-196, 2011.

LEDEBOER, N.A.; FRYE, J.G.; MCCLELLAND, M.; JONES, B.D. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. **Infect Immun**, v. 74, p.3156–3169, 2006.

LEY, B.; LE HELLO, S.; LUNGUYA, O.; LEJON, V. et al. Invasive *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections, Democratic Republic of the Congo, 2007-2011. **Emerg Infect Dis**, v.20, p.701-704, 2014.

LOVE, M.I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, v.15, p.550, 2014.

LOKKEN, K.L.; MOONEY, J.P.; BUTLER, B.P.; XAVIER, M.N. et al. Malaria parasite infection compromises control of concurrent systemic non-typhoidal *Salmonella* infection via IL-10 mediated alteration of myeloid cell function. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 5, e10040, 2014.

LUSTRI, B.C., SPERANDIO, V.; MOREIRA, C.G. Bacterial Chat: Intestinal metabolites and signals in host-microbiota pathogen interactions. **Infect Immun**, v.85, p. e00476-17, 2017.

MARCUS, S.L.; BRUMELL, J.H.; PFEIFER, C.G.; FINLAY, B.B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microb Infect**, v.2, p.145–156, 2000.

MARMARAS, V.J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. **Cell Signal**, v.21, p.186-195, 2009.

MCKINNEY, J.; ZU BENTRUP, K.; MUÑOZ-ELÍAS, E.; MICZAK, A. et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature**, v.406, p.735-738, 2000.

MOREIRA, C.G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence *in vitro* and *in vivo*. **Infect Immun**, v.78, p.914-926, 2010.

MCARTHUR, A.G.; WAGLECHNER, N.; NIZAM, F.; YAN, A. et al. The comprehensive antibiotic resistance database. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, p.3348-3357, 2013.

MCDERMOTT, P.F.; TYSON, G.H.; KABERA, C.; CHEN, Y. et al. Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.60, p.5515-5520, 2016.

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 Journal**, v.20, p.2131-2139, 2001.

MUKHERJEE, K.; ALTINCICEK, B.; HAIN, T.; DOMANN, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria pathogenesis*. **Appl Environ Microbiol**, v.76, p.310-317, 2010.

MUNITA, J.M.; ARIAS, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiol Spectr**, v.4, p.1-37, 2016.

NADALIN, F.; VEZZI, F.; POLICRITI, A. GapFiller: a de novo assembly approach to fill the gap within paired reads. **BMC Bioinformatics**, v. 13, Suppl 14, S8, 2012.

NEEDHAM, B.D.; TRENT, S.M. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v.11, p.467-481, 2013.

NUCCIO, S.P.; BAUMLER, A.J. Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. **MBio**, v.5, p.e00929–14, 2014.

OCHMAN, H.; SONCINI, F.C.; SOLOMON, F.; GROISMAN, E.A. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, p.7800- 7804, 1996.

OKORO, C.K.; KINGSLEY, R.A.; CONNOR, T.R.; HARRIS, S.R. et al. Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in saarianana África subsaariana. **Nat Genet**, v.44, p.1215-1221, 2012.

PEREZ-SEPULVEDA, B.M.; HEAVENS, D.; PULFORD, C.V.; PREDEUS, A.V. et al. An accessible, eficiente and global approach for the large-scale sequencing of bacterial genomes. **Genome Biol.** v.22, p.1-18, 2021.

POST, A.S.; DIALLO, S.N.; GUIRAUD, I.; LOMPO, P. et al. Supporting evidence for a human reservoir of invasive non-Typhoidal *Salmonella* from household samples in Burkina Faso. **PLoS Negl Trop Dis**, v.13, p.1-18, 2019.

PULFORD, C.V.; PEREZ-SEPULVEDA, B.M.; CANALS, R.; BENVIGTON, J.A. et al. Stepwise evolution of *Salmonella* Typhimurium ST313 causing bloodstream infection in Africa. **Nat Microbiol**, v.6, p.327-338, 2020.

PFEIFER, C.G.; MARCUS, S.L.; STEELE-MORTIMER, O.; KNODLER, L.A. et al. *Salmonella* Typhimurium virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. **Infect Immun**, v.67, p.5690-5698, 1999.

PRECIADO-LLANES, L.; AULICINO, A.; CANALS, R.; MOYNIHAN, P.J. et al. Evasion of MAIT cell recognition by the African *Salmonella* Typhimurium ST313 pathovar that causes invasive disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.117, p. 20717–20728, 2020.

RAMACHANDRAN, G.; PERKINS, D.J.; SCHMIDLEIN, P.J.; TULAPURKAR, M.E. et al. Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 with naturally attenuated flagellin elicits reduced inflammation and replicates within macrophages. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, p.e3394, 2015.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The Insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **J Vis Exp**, v.70, p.e4392, 2012.

REENS, A.L.; NAGY, T.A.; DETWEILER, C.S. *Salmonella enterica* requires lipid metabolism genes to replicate in proinflammatory macrophages and mice. **Infect Immun**, v.88, p.e00776-19, 2020.

REDDY, E. A.; SHAW, A. V.; CRUMP, J. A. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v.10, p.417-432, 2010.

RIVERA-CHAVEZ, F.; WINTER, S.E.; LOPEZ, C.A.; XAVIER, M.N.; WINTER, M.G. et al. *Salmonella* uses energy taxis to benefit from intestinal inflammation. **PLoS Pathog**, v.9, p.e1003267, 2013.

RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. **Vet Microbiol**, v.112, p.1–10, 2006.

SERIBELLI, A.A.; CRUZ, M.F.; VILELA, F.P.; FRAZÃO, M.R. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from humans and foods in Brazil. **PLoS One**. v.15, p.1-18, 2020.

SERIBELLI, A.A.; SILVA, P.; CRUZ, M.F.; ALMEIDA, F. et al. Insights about the epidemiology of *Salmonella* Typhimurium isolates from different sources in Brazil using comparative genomics. **Gut Pathog**. 13, p.1-15, 2021a.

SERIBELLI, A.A.; SILVA, P.; FRAZÃO, M.R.; DEON, J. et al. Phylogenetic relationship and genomic characterization of *Salmonella* Typhimurium strains isolated from swine in Brazil. **Infect Genet Evol**, v.93, p.1-13, 2021c.

SERIBELLI, A.A.; RIBEIRO, T.R.M.; SILVA, P.; MARTINS, I.M. et al. *Salmonella* Typhimurium ST313 isolated in Brazil revealed to be more invasive and inflammatory in murine colon compared to ST19 strains. **J Microbiol**. v.59, p.861-870, 2021b.

SILVA, P.; LUSTRI, B.C.; CASTILHO, I.G.; FERREIRA, A.M. et al. Genome profiling of fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. **Braz J Microbiol**, v.52, p.1067-1075, 2021.

SINGLETERY, L.A.; KARLINSEY, J.E.; LIBBY, S.J.; MOONEY, J.P. et al. Loss of multicellular behavior in epidemic African nontyphoidal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ST313 strain D23580. **MBio**, v.7, p.e02265, 2016.

SIMPSON, J.T.; DURBIN, R. Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures. **Genome Res**, v.22, p.549-556, 2012.

SCALFARO, C.; IACOBINO, A.; NARDIS, C.; FRANCIOSA, G. *Galleria mellonella* as an in vivo model for assessing the protective activity of probiotics against gastrointestinal bacterial pathogens. **FEMS Microbiol Lett**, v.364, p.1-6, 2017.

SCORZONI, L.; PAULA SILVA, A.C.; SINGULANI, J.L.; LEITE, F.S. et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v.6, p.766-76, 2015.

SHEA, J.E.; BEUZON, C.R.; GLEESON, C.; MUNDY, R. et al. Influence of the *Salmonella* Typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. **Infect Immun**, v.69, p.213–219, 1999.

SHEA, J.E.; HENSEL, M.; GLEESON, C.; HOLDEN, D.W. Identification of a virulence locus encoding a second type III system in *Salmonella* Typhimurium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, p.2593-2597, 1996.

SLATER, J.L.; GREGSON, L.; DENNING, D.W.; WARN, P.A. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. **Med Mycol**, v.49 Suppl 1, p.S107-S113, 2011.

SRIKANTH, C. V.; MERCADO-LUBO, R.; HALLSTROM, K.; MCCORMICK, B.A. *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. **Cell Mol Life Sci**, v.68, p.3687–3697, 2011.

STANAWAYE, D. et al. The global burden of non-typhoidal *Salmonella* invasive disease: a systematic analysis for the global burden of disease Study 2017. **Lancet Infect. Dis**, v.19, p.1312–1324, 2019.

SCHULTZ, B.M.; MELO-GONZALEZ, F.; SALAZAR, G.A.; PORTO, B.N. et al. New insights on the early interaction between typhoid and non-typhoid *Salmonella* serovars and the host cells. **Front Microbiol**, v.12, 2021.

SUN, J. et al. The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007-2011. **PLoS One**, v.9, p.e113145, 2014.

TAMANG, M.D. et al. Antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from healthy and diseased pigs in Korea. **J Food Prot**, v.77, p.1481, 2014.

TAYLOR, S.J.; WINTER, S.E. *Salmonella* finds a way: Metabolic versatility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in diverse host environments. **PLoS Pathog**, v.16, p.e1008540, 2020.

TSAI, C.N.; COOMBES, B.K. Emergence of invasive *Salmonella* in Africa. **Nat Microbiol**, v.6, p.273–274, 2021.

UCHE, I.V.; MACLENNAN, C.A.; SAUL, A.A. Systematic review of the incidence, risk factors and case fatality rates of invasive nontyphoidal *Salmonella* (iNTS) disease in Africa (1966 to 2014). **PLoS Negl Trop Dis**, v.11, p.e0005118, 2017.

VIEGAS, S.C.; MIL-HOMENS, D.; FIALHO, A.M.; ARRAIANO, C.M. The virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the insect model *Galleria mellonella* is impaired by mutations in RNase E and RNase III. **Appl Environ Microbiol**, v.79, p.6124-6133, 2013.

VILLA, L.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; FORTINI, D.; CARATTOLI, A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **J Antimicrob Chemother**, v.65, p.2518–2529, 2010.

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, p.5445-5455, 2006.

WANG, X.; BISWAS, S.; PAUDYAL, N.; PAN, H. et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016. **Front Microbiol**, v.10, p.985, 2019.

WEMYSS, M.A.; PEARSON, J.S. Host cell death responses to Non-typhoidal *Salmonella* infection. **Front Immunol**, v.10, p.1-10, 2019.

YANG, S.Y.; ELZINGA, M. Association of both enoyl coenzyme A hydratase and 3-hydroxyacyl coenzyme A epimerase with an active site in the amino-terminal domain of the multifunctional fatty acid oxidation protein from *Escherichia coli*. **J Biol Chem**, v.268, p.6688-6692, 1993.

YIMGA, M.T.; LEATHAM, M.P.; ALLEN, J.H.; LAUX, D.C. et al. Role of gluconeogenesis and the tricarboxylic acid cycle in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Balb/c mice. **Infect Immun**, v.74, p.1130–1140, 2006.

ZANKARI, E.; HASMAN, H.; COSENTINO, S.; VESTERGAARD, M. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother**, v.67, p.2640-2644, 2012.