



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 (iNTS) / 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 (PASQUIBAC), 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 estreptomicina, 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

Figura 1. Esquema de vias de metabolismo lipídico em <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	16
Figura 2. Estratégia de nocaute via Lambda Red.....	25
Figura 3. 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
Figura 4. 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
Figura 5. qRT-PCR dos alvos <i>fadA</i> e <i>citX</i>	34
Figura 6. Checagem da mutagênese via PCR dos alvos <i>fadA</i> e <i>citX</i>	35
Figura 7. Curva de crescimento em meio Luria-Bertani.....	36
Figura 8. Curva de crescimento em meio M9	36
Figura 9. Curva de crescimento em M9 suplementado com glicose.....	37
Figura 10. Curva de crescimento em M9 suplementado com ácido oleico.....	37
Figura 11. Ensaio de invasão em células HeLa.	38
Figura 12. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM.....	39
Figura 13. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM com glicose.....	39
Figura 14. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM com ácido oleico..	40
Figura 15. <i>Galleria mellonella</i>	41
Figura 16. Análise histopatológica do intestino de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. Typhimurium</i> SL1344 (ST19).....	42
Figura 17. Análise histopatológica do intestino de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. Typhimurium</i> ST313 selvagem.....	43
Figura 18. Análise histopatológica do intestino de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. Typhimurium</i> ST313 mutante <i>fadA</i>	43
Figura 19. Análise histopatológica do intestino de <i>G. mellonella</i> infectada por <i>S. Typhimurium</i> ST313 mutante <i>citX</i>	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Identificação e ano de isolamento das 13 linhagens de <i>S. Typhimurium</i> ST313 provenientes de hemoculturas humanas utilizadas no estudo.....	20
Tabela 2. Primers utilizados na técnica de qRT-PCR.....	23
Tabela 3. Primers utilizados na mutagênese.....	25
Tabela 4. Primers utilizados na checagem da mutagênese.....	25
Tabela 5. Perfis de resistência genotípica e fenotípica das 13 linhagens de <i>S. Typhimurium</i> ST313 estudadas.....	29
Tabela 6. 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. ₆₀₀	<i>Densidade Óptica a 600 nanômetros</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
H&E.....	<i>Hematoxilina e Eosina</i>
iNTS	<i>invasive non-typhoidal Salmonella</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
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	<i>Ilha de Patogenicidade de Salmonella</i>
ST.....	<i>Sequence Type</i>
TCA.....	<i>Ciclo do Ácido Tricarboxílico</i>
TGI.....	<i>Trato Gastrointestinal</i>
T3SS	<i>Sistema de Secreção do Tipo 3</i>
VFDB	<i>Virulence Factors Database</i>
$\Delta\Delta C_t$	<i>Comparative Critical Threshold</i>
WT	<i>Wild Type</i>
ZEO	<i>Zeomicina</i>

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 IncFII 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).

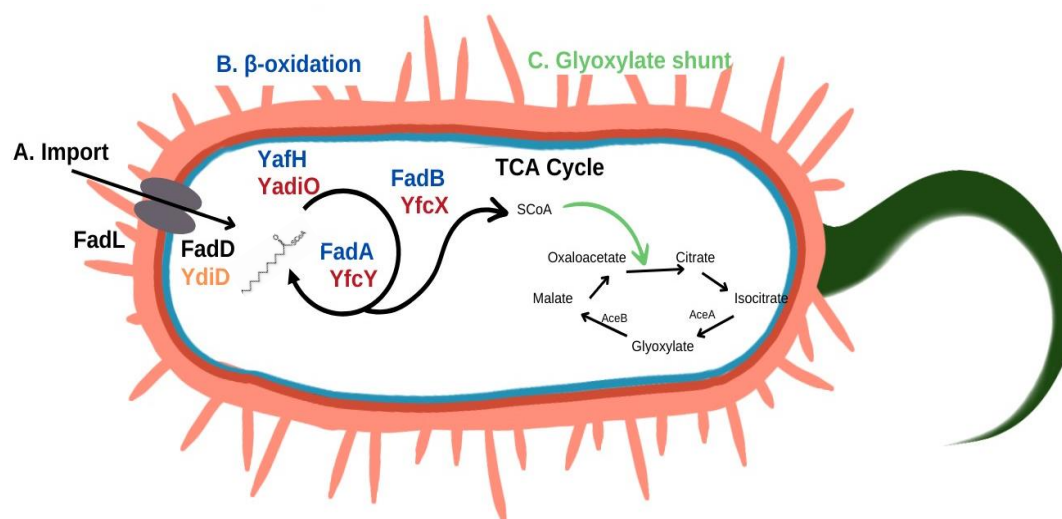
1.2 Metabolismo

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 β -oxidados via YafH ou YdiO, FadB ou YfcX e FadA ou YfcY. O produto é metabolizado através do ciclo TCA. A β -oxidação canônicos são azuis e a β -oxidação secundária em vermelho. (C) O desvio do glioxilato (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 β -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 glioxilato 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 glioxilato, 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 hemocoele e são facilmente cultivadas em grande número a baixo custo (BENDER *et al.*, 2013).

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

S. Typhimurium é um dos principais sorovares que frequentemente causa gastroenterite autolimitante no mundo. No entanto, na África subsaariana linhagens pertencentes ao ST313 são a causa mais comum de infecções na corrente sanguínea que ameaçam a vida, principalmente por acometer indivíduos com comorbidades (LOKKEN *et al.*, 2014).

No Brasil, há poucos trabalhos publicados com *S. Typhimurium* ST313 provenientes de hemoculturas hospitalares. Alguns trabalhos relataram o perfil de resistência e a presença ou ausência do plasmídeo de virulência de linhagens de *S. Typhimurium* ST313 isoladas de várias fontes, como alimentos, fezes humanas e apenas uma linhagem de sangue humano (ALMEIDA *et al.*, 2018; SERIBELLI *et al.*, 2020). Em relação ao RNAseq e o teste de virulência em modelo alternativo, poucos são os trabalhos encontrados na literatura com linhagens provenientes de hemoculturas e comparadas a linhagem africana D23580 (SERIBELLI *et al.*, 2020; SERIBELLI *et al.*, 2021b).

Portanto, devido à escassez de estudos com hemoculturas hospitalares de linhagens *S. Typhimurium* ST313, estudos que abordem diferentes aspectos da biologia, genética e epidemiologia desse ST são de grande importância. Dessa forma, verificar o perfil de resistência a antimicrobianos, caracterização da diversidade genotípica, ensaio *in vitro* e em modelo alternativo contribuirá no conhecimento dessas linhagens circulantes no país. Ademais, pelo nosso conhecimento não há nenhum trabalho publicado que analisou o RNAseq de *S. Typhimurium* ST313 em meio de crescimento suplementado com sangue.

3. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo geral a análise genômica e transcriptômica da linhagem de *S. Typhimurium* ST313, além de compreender a adaptação em ambientes de crescimento diferenciados, a fim de mimetizar condições do ambiente intestinal e sanguíneo. A investigação da patogênese detalhada *in vitro* em células HeLa e macrófagos J774 e *in vivo* no modelo alternativo de *Galleria mellonella*.

Objetivos específicos

- Análise do perfil de resistência de linhagens de *S. Typhimurium* ST313 isoladas do sangue humano através da análise genômica de genes de resistência, além do ensaio fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos.
- Análise genômica de plasmídeo associado à virulência.

- Análise transcriptômica da expressão de novos fatores em diferentes condições de crescimento e correlacionando-a aos pontos ainda não explorados do processo patogênico de *S. Typhimurium* ST313.
- Análise dos mecanismos metabólicos para a sobrevivência de *S. Typhimurium* ST313 ao nicho extra intestinal.
- Investigação da patogênese *in vitro* em células HeLa e em meios diferenciais em macrófagos J774
- Avaliação da patogênese em modelo alternativo de infecção como *Galleria mellonella*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 48 linhagens de *Salmonella* spp. provenientes de hemoculturas de pacientes do Hospital Universitário da UNESP em Botucatu – SP foram isoladas durante o período de 1998 a 2011 em trabalho colaborativo com o Dr. Rodrigo T. Hernandez, Dra. Terue Sadatsune e Msc. Adriano M. Ferreira. Foram realizados os sequenciamentos dos genomas completos de todas as linhagens em colaboração com o Projeto 10,000 *Salmonella* Genomes pela Universidade de Liverpool e, identificadas 13 linhagens de *S. Typhimurium* ST313.

As 13 linhagens de *S. Typhimurium* ST313, ST19 (SL1344) e D23580 foram cultivadas em agitação a 37°C sob condições aeróbias em Luria-Bertani (LB) ou LB suplementado com 5% de sangue de carneiro, conforme a necessidade do estudo (**Tabela 1**). Todas as linhagens estão disponíveis na coleção de bactérias do Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana (PASQUIBAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP de Araraquara - SP. Diante dos resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos e genes de virulência plasmidiais (Material Suplementar 1), escolheu-se uma linhagem para a realização do RNAseq, qRT-PCR e infecção no modelo alternativo de *Galleria mellonella*.

Tabela 1. Identificação e ano de isolamento das 13 linhagens de *S. Typhimurium* ST313 provenientes de hemoculturas humanas utilizadas no estudo

Nome do isolado	Ano de isolamento
78	1998
220	1998
522*	1998
2366	1998
31217	2004
32714	2004
339	2007
1880	2008
2081	2008
3956	2010
4270	2010
5339	2010
1435	2011

Fonte: O autor.

*amostra selecionada para os seguintes testes: RNAseq, qRT-PCR, mutagênese, curva de crescimento, ensaios em células HeLa e macrófagos J774 e modelo alternativo *Galleria mellonella*.

4.1. Sequenciamento de genoma completo

O sequenciamento completo dos genomas das 13 *S. Typhimurium* ST313 foi realizado em colaboração com o Projeto 10,000 *Salmonella* Genomes pela Universidade de Liverpool, laboratório Jay Hinton, realizado no HiSeq 4000 (PEREZ-SEPULVEDA *et al.*, 2021). Os genomas das *S. Typhimurium* ST313 foram montados conforme descrito anteriormente (SERIBELLI *et al.*, 2021c; SILVA *et al.*, 2021). Brevemente, *raw reads* foram processadas pelo *a5 pipeline* (August 2016 version) (COIL *et al.*, 2015), iniciando trinar os dados com Trimmomatic (BOLGER *et al.*, 2014), realizando a qualidade filtrando e removendo as sequências de adaptadores, bases de baixa qualidade (*phred score quality* < 28), e curtas leituras (>35 bp). As correções de erros de leitura foram realizadas pelo SGA (SIMPSON; DURBIN, 2012), seguindo o IDBA-UD algoritmo (PENG *et al.*, 2012) para montagem *de novo* foi sucedido por SSPACE *scaffolding* (BOETZER *et al.*, 2011). Em seguida, foi executado a montagem por referência através do MeDuSa 1.6 (BOSI *et al.*, 2015), utilizando os genomas depositados das linhagens de *S. Typhimurium* LT2, ST19 (SL1344), ST4-74, 14028S e D23580 para guiar os *scaffolds* na ordem de orientação correta, construindo um *scaffold* único. Os *scaffolds* finais foram passados por até 20 interações no Gapfiller 1.10 (NADALIN *et al.*, 2012), usando as leituras corrigidas de erros para preencher as lacunas entre as sequências de *contigs*, melhorando a contagem de L₅₀ *contig* (Apêndice 1).

4.2. Plasmídeo de virulência e genes de resistência

Os genes plasmidiais de virulência foram pesquisados em trabalho colaborativo pela Dra. Amanda Aparecida Seribelli. Para as 13 linhagens de *S. Typhimurium* ST313 usou-se o *Virulence Factors Database* (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) com um limiar de $\geq 70\%$, identidade de $\geq 70\%$ e cobertura em comparação com o plasmídeo de *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium str. LT2 pSLT, 93939 bp, NC_003277 (CHEN *et al.*, 2005).

A presença do plasmídeo foi determinada usando o PlasmidFinder (*Center for Genomic Epidemiology*, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) com um limite definido no mínimo de 95% de identidade e cobertura mínima de 60% (CARATTOLI *et al.*, 2014). O BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizado para confirmar a localização, porcentagem de identidade e cobertura entre *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium str. LT2 pSLT, 93939 bp, NC_003277, sequências de referência do plasmídeo pSLT e dos genes *pvABCDR*, *pefABCD*, *rck* e *mig-5* com os genomas positivos e negativos para IncFIIs.

Os genes de resistência foram detectados através do ResFinder 4.1 - *Center for Genomic Epidemiology* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) com configurações de limiar de 90% e cobertura mínima de 60%. O *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) com alta qualidade/cobertura (inclui contigs > 20,000 bp e exclui predição de genes parciais) que está disponível em <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi> também foi realizado para todas as linhagens (ZANKARI *et al.*, 2012; MCARTHUR *et al.*, 2013). Ambas as análises foram realizadas em trabalho colaborativo pela Dra. Amanda Aparecida Seribelli.

4.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de linhagens ST313

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado pelo Método de Difusão para 11 antimicrobianos, incluindo ampicilina (10 µg), estreptomicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10µg), canamicina (30µg), tetraciclina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), sulfonamidas (300 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (1.25/23.75 µg), ciprofloxacina (5 µg) e colistina (10µg), seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2020). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como controle dos discos utilizados (ALMEIDA *et al.*, 2018).

4.4. Extração de RNA para análise da expressão gênica

S. Typhimurium ST313 522/98 foi cultivada em LB ou LB suplementado com 5% de sangue de carneiro a 37°C sob agitação até atingir uma densidade ótica de 1,0 a 600 nm. A fim de romper células e inativar nucleases foram utilizados 500 µL de TRIzol® (Life Technologies) e o RNA foi extraído usando o kit RNA RiboPure®Bacteria (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A verificação da concentração e pureza do RNA total extraído foi analisada pelo NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) definido em 260 nm e 280 nm. Os RNAs extraídos com variação entre 2.0 e 2.2 foram considerados apropriados, assim como o Bioanalyzer RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) e Bioanalyzer DNA 1000 kit (Agilent Technologies) foram usados para quantificação e verificação da qualidade das amostras. O RNA ribossomal foi depletado usando o kit QIAseq FAST Select (Qiagen®) e convertido em biblioteca de cDNA pela transcriptase reversa com o kit TruSeq®Stranded mRNA (Illumina). Após a preparação da biblioteca, foi quantificado pelo QIAseq Library Quant System (Qiagen®), usando o método de curva padrão para realizar o sequenciamento com o MiSeq® v3 kit (Illumina). O sequenciamento foi realizado usando o MiSeq®sequencer (Illumina) e as amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.5. Mapeamento de bibliotecas de RNAseq e análise da expressão diferencial de genes

O alinhamento e montagem dos transcriptomas foram feitos em trabalho colaborativo pelo Dr. Patrick da Silva. Para isso, inicialmente *raw reads* serviram como entrada para o Trimmomatic (BOLGER *et al.*, 2014), realizando a filtragem de qualidade e removendo adaptadores de sequência Illumina, bases de baixa qualidade (*phred score quality* > 20) e leituras menores que 35 bp. A trimagem foi seguida de correção de erro de leitura pela SGA *k*-mer- baseado no algoritmo (SIMPSON; DURBIN, 2012). As leituras pré-processadas foram comparadas às leituras brutas por meio do FastQC análises (ANDREWS, 2010) para avaliar o corte de qualidade realizado anteriormente.

Em seguida, as leituras foram mapeadas contra *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ST19 (SL1344) genoma de referência (KRÖGER *et al.*, 2012) código de acesso GCA_000210855.2, usando o Bowtie2 software (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) seguindo a otimização descrita anteriormente (BARUZZO *et al.*, 2017).

A diferença de expressão genética inicial foi denominada *counting the number* de leituras de cada transcrição através do HTSeq (ANDERS *et al.*, 2015). Finalmente, a contagem dos dados diretos foi para a análise diferencial pelo pacote DESeq2 R (LOVE *et al.*, 2014).

4.6. Análise de ontologia gênica

A análise da Ontologia gênica foi realizada pelo *Gene Ontology Unifying Biology* disponível em <https://geneontology.org> a fim de determinar processos biológicos únicos na linhagem *S. Typhimurium* ST313.

4.7. Análise de expressão por qRT-PCR

A técnica de qRT-PCR foi realizada conforme descrita por Walters e Sperandio, 2006. *S. Typhimurium* ST313 522/98 foi cultivada em LB ou LB suplementado 5% de sangue de carneiro a 37°C sob agitação até atingir uma densidade ótica de 1,0 a 600 nm para extração de RNA utilizando o kit RiboPure® Bacteria RNA isolation (Ambion-Life). Primers foram desenhados (**Tabela 2**) com o Primer Express v1.5 (Applied Biosystems), utilizando como molde o genoma de referência *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium SL1344, código de acesso GCA_000210855.2 (*Genbank*). Real-time reverse transcription (RT)-PCR foi realizado em triplicadas biológicas duplicadas no ABI7500 sequence detection system (Applied Biosystems). A reação de 20µL conteve o SYBR® Green Select, a transcriptase reversa (Applied Biosystems) e RNase inhibitor (Applied Biosystems) adicionados, além de 100ng de RNA de cada amostra por reação, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram normalizadas com o emprego do *rpoA* (*RNA polymerase subunit A*) como controle endógeno. Os resultados coletados foram processados com o *ABI Sequence Detection 1.3 software* (Applied Biosystems) e analisados pelo método de *Comparative Critical Threshold* ($\Delta\Delta C_t$). A técnica de qRT-PCR foi empregada para confirmar os níveis de expressão dos genes *fadA* e *citX* encontrados no RNAseq (Tabela. 2).

Tabela 2. Primers utilizados na técnica de qRT-PCR

Nome	Sequência	Referência
<i>fadA_forw</i>	GAAGATCTCTCCGCCCCACTT	Este estudo
<i>fadA_rev</i>	TGTACGCAGCCCCAGTAAAT	Este estudo
<i>citX_forw</i>	CCACTCCACTGGTCTCCTTT	Este estudo
<i>citX_rev</i>	CGTGATTAAAGATCCGGCGG	Este estudo

Fonte: O autor.

4.8. Construção de mutantes isogênicos

A mutagênese foi realizada empregando a técnica de Lambda Red conforme literatura (DATSENKO; WANNER, 2000; HERNANDES *et al.*, 2013) (**Figura 2**). A técnica utiliza a expressão de enzimas de recombinação do fago Lambda contidas no plasmídeo. Através da recombinação, o gene alvo é nocauteado e substituído por um cassete

de resistência a antibiótico contido no plasmídeo termossensível pKOBEG-Apra, amplificado previamente com auxílio de primers contendo uma região de 40 pb homóloga às extremidades 5' e 3' dos genes alvo (*fadA* e *citX*) e a sequência específica para o gene codificador de resistência a zeomicina (Zeo) foi usada para amplificar o cassete de Zeo. (Tabela 3). Para a mutagênese sempre são utilizadas cepas hospedeiras isogênicas, e nocauteados genes alvos de relevância para melhor entendimento do processo patogênico.

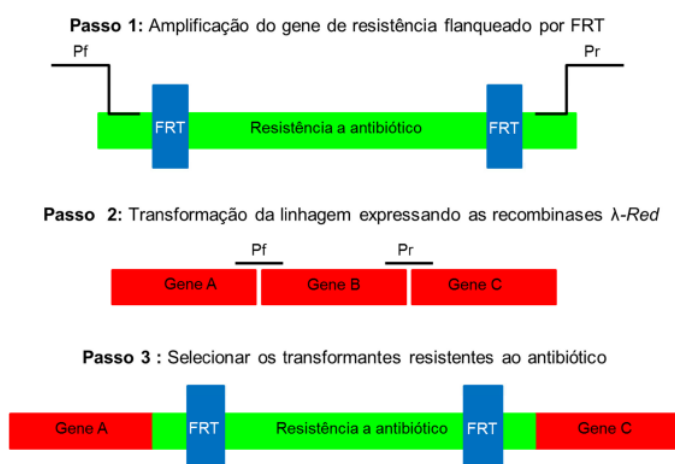
O protocolo de mutagênese consiste em preparação das células eletro-competentes, eletroporação e plaqueamento seletivo. O preparo de células eletro-competentes foi feito através da cultura *overnight* da linhagem *S. Typhimurium* ST313 522/98 em ágar LB a 37 °C, no qual algumas colônias isoladas foram colocadas sob agitação em 25 mL de meio líquido LB. Após a cultura atingir a DO₆₀₀ de 0.6, o conteúdo foi transferido para um tubo de fundo cônico de 50 mL e centrifugado a 4000 rpm durante 6 minutos, na temperatura de 4 °C. Após remoção do sobrenadante as células foram lavadas 3 vezes com água estéril gelada, repetindo as centrifugações, e por último ressuspensas em 100 µL de água. Em seguida a eletroporação foi feita em cubeta de 0,2 cm (BIO-RAD®) a 2,5 kV, 25 µF a 200 Ω, adicionando 50 µL de células eletrocompetentes e 5-10 µL do produto da PCR purificado e concentrado, com auxílio do eletroporador GenePulser Xcell (BIO-RAD®).

Após o choque as células foram ressuspensas em 1 mL de meio líquido LB e mantidas em estufa 37°C por 4 horas. Por fim, o plaqueamento seletivo foi feito em ágar LB contendo Zeo, adicionando-se 200 µL da amostra e mantendo-as *overnight* em estufa 37°C. O restante das células foi mantido em temperatura ambiente até o dia seguinte, concentradas após centrifugação e plaqueadas como anteriormente. As colônias que cresceram nas placas foram novamente colocadas em meio LB contendo zeomicina para confirmar o crescimento, e posteriormente foram feitas reações de PCR (Tabela 4) para verificar as mutações. Por fim, o sequenciamento foi realizado no Laboratório de Análises Biomoleculares Multiusuários, localizado na Unesp-FCFAR com a colaboração da técnica Mariana Marchi Santoni Biasioli. Foi utilizando o kit Big Dye (Thermo Fisher) para confirmação do nocaute e as linhagens mutantes foram armazenadas em freezer -80 °C.

Tabela 3. Primers utilizados na mutagênese

Nome	Sequência	Referência
<i>fadA</i> -zeo (F)	AAGGAGTCACAATGGAACAGGTTGTCATTGTCTGATGCTATTCGCA CCCCGGTCATCGCTTGCATTAGAAAGG	Este estudo
<i>fadA</i> -zeo (R)	TTAAACCCGCTCAAACACCGTGGCGATGCCCTGACCCAGACCAAT ACACAGAATGATGCAGAGATGTAAG	Este estudo
<i>citX</i> -zeo (F)	CAGGTGAAGGAATAAGCCATGCGCCTGTTTCCTGAACTCGCCACC TGTCAGTCATCGCTTGCATTAGAAAGG	Este estudo
<i>citX</i> -zeo (R)	TTAGTCGGGTTGGCGGGAATCGGCATCATGCAGCAGCGCCTCCAT ATGAA GAATGATGCAGAGATGTAAG	Este estudo

Fonte: O autor.

Figura 2. Estratégia de nocaute via Lambda Red

Fonte: Adaptado de Datsenko (DATSENKO; WANNER, 2000).

Figura 2. Estratégia de nocaute via Lambda Red. Através da recombinação, o gene alvo é nocauteado e substituído por um cassete de resistência a antibiótico contido em um plasmídeo auxiliar, amplificado previamente com auxílio de primers contendo região de homologia à região do gene a ser nocauteado.

Tabela 4. Primers utilizados na checagem da mutagênese

Nome	Sequência	Referência
<i>fadA</i> (F)	ATCTTGATATGGCGCAGCAG	Este estudo
<i>fadA</i> (R)	CTGTTTCCCGTCATAATTCGCG	Este estudo
<i>citX</i> (F)	AGTGGTATCGATTGAGTGCC	Este estudo
<i>citX</i> (R)	AGTTTAGTCGGTCTACCAGACC	Este estudo

Fonte: O autor.

4.9. Curva de crescimento

A curva de crescimento bacteriana foi realizada a partir de cultivos prévios (16-18h) das linhagens SL1344(ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ de acordo com Reens et al. (2020) com modificações. Os cultivos bacterianos foram diluídos para uma densidade

óptica de 0,01 (600_{nm}) em meio LB, M9, M9 suplementado com 0,4% de dextrose ou 0,1% de oleato de sódio e 1% de TWEEN[®] 20 (Sigma[®]), que foi necessário para solubilizar o oleato. As bactérias foram incubadas em microplacas de 96 poços com um volume final de 200 µL a 37°C e agitação orbital ($\cong$ 143 rpm) no leitor de microplacas Tecan Infinite 200 Pro (Tecan, Männedorf, Suíça). O crescimento foi mensurado por leitura de absorbância a 600nm por 24 horas.

4.10. Ensaio de invasão em células HeLa

A virulência das linhagens SL1344(ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ foram mensuradas através da quantificação da invasão em células epiteliais HeLa (*in vitro*) em ensaio com gentamicina. Infectadas com um MOI (*Multiplicity of infection*) de 100:1 durante 90 minutos a 37°C em 5% CO₂, com os inóculos bacterianos normalizados na mesma D.O.₆₀₀. Após a interação, células bacterianas e células HeLa foram tratadas com gentamicina 30 µg/ml por 1 hora para matar as bactérias extracelulares remanescentes. Assim, após uma incubação extra de 3 horas a 37°C em 5% CO₂, lisou-se as células HeLa com solução de Triton-X 100 (1%). Por fim, as bactérias foram diluídas serialmente e plaqueadas em ágar LB para determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de cada linhagem testada em triplicata (FINLAY *et al.*, 1991; FIERER *et al.*, 1993; PFEIFER *et al.*, 1999; MOREIRA *et al.*, 2010).

4.11. Ensaio de replicação em macrófagos

O ensaio de replicação em macrófagos J774 foram realizados em meios diferenciais conforme descrito por Reens *et al.* (2020), com algumas modificações. Vinte e quatro horas antes da infecção, os macrófagos foram transferidos para *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) livre de glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM L-glutamina, 1X aminoácidos não essenciais (alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, prolina e ácido glutâmico; Sigma[®]). Meio sem glicose foi suplementado com 4,5 g/litro de glicose ou ácido oleico 600 µM (conjugado 6:1 com albumina de soro bovino [BSA]; ácido oleico concentrado dissolvido em 0,1 M Na₂CO₃ a 55°C, foi adicionado BSA dissolvido em PBS, agitado por 1 h a 37°C, esterilizado por filtração).

As linhagens SL1344(ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ foram opsonizadas com soro de camundongo a 37°C durante 15 minutos e lavadas com PBS estéril, utilizando um MOI (*Multiplicity of infection*) de 100:1 durante 30 minutos a 37°C em 5% CO₂, com os inóculos normalizados na mesma D.O.₆₀₀. Essas células bacterianas após interação com macrófagos J774 foram tratadas com gentamicina 40 µg/ml por 1 hora para matar as

bactérias extracelulares remanescentes. Após uma incubação extra de 3 horas a 37°C em 5% CO₂ os macrófagos J774 foram lisados com solução de Triton-X de (1%). Por fim as bactérias foram diluídas serialmente e plaqueadas em ágar LB para determinação das UFC de cada linhagem testada em triplicata (FINLAY *et al.*, 1991; FIERER *et al.*, 1993; PFEIFER *et al.*, 1999).

4.12. Virulência no modelo alternativo *Galleria mellonella*

As linhagens ST19 (SL1344), ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ foram cultivadas a 37°C em meio LB *overnight* (16-18h), posteriormente, centrifugadas (5000 x g, 5 minutos) e o sobrenadante descartado, o *pellet* ressuscitado em 1000 μ L de PBS, diluída na concentração de 10⁶ UFC/larva. Os experimentos foram realizados conforme descrito por Scalforo *et al.* (2017), com algumas modificações. A suscetibilidade das larvas de *G. mellonella* às bactérias utilizadas neste estudo foi testada com um ensaio de desafio. Grupos de 10 larvas para cada linhagem foram inoculados utilizando micro seringa Hamilton, por injeção de 10 μ L nas concentrações citadas acima de cada suspensão bacteriana na hemocele através do último *pro-leg* esquerdo. Após a injeção, as larvas foram colocadas em placas de petri estéreis, incubadas no escuro a 37°C e o número de larvas mortas foi contado e registrado diariamente durante 3 dias. Como controle, animais injetados com PBS foram incluídos em cada experimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Foi realizado a observação da deposição de melanina nas larvas de *G. mellonella*. A infecção de insetos pode ser acompanhada pela geração de melanina que se deposita ao redor do patógeno e como consequência as larvas mudam da cor creme normal para o marrom escuro (RAMARAO *et al.*, 2012).

4.13. Análise histopatológica do modelo alternativo *Galleria mellonella* infectadas com *S. Typhimurium*

Para análise histopatológica foi realizada a antissepsia das larvas com álcool 70% e em seguida lavagem com PBS estéril e secagem com gaze. Posteriormente, as larvas foram colocadas no gelo durante 2-3 minutos até não apresentarem movimentação. As larvas permaneceram em solução de paraformaldeído 4% durante 24 horas e foram mantidas em paraformaldeído 10% até o momento do processamento. O material foi parafinizado e realizados cortes, desparafinizados e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) pelo laboratório Histocell em São Paulo- SP. As análises das lâminas foram realizadas com a colaboração do Professor Dr. Paulo Fernandes Marcusso (Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia- Unesp, Botucatu-SP) em microscópio Olympus BX60 e o programa de imagem foi o 4K-UHD Opticam.

4.14. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do GraphPad Prism v8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, CA) pelo método Teste T pareado. Os dados foram considerados significativos quando foi $p < 0.05$. As análises gráficas e estatísticas do ensaio de virulência em *Galleria mellonella* foram realizadas pelo método Long-rank (Mantel-Cox), ambos no programa GraphPad Prism v 8.2.1, os dados foram considerados significativos quando foi $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise de genes resistência

Os genes de resistência *acrA*, *acrB*, *mdtK*, *emrB*, *emrR*, *mdsA* e *mdsB* relacionados com a produção de bombas de efluxo foram detectados em todas (100%) *S. Typhimurium* ST313 provenientes do sangue de pacientes do Hospital Universitário. A porcentagem de cobertura e identidade para todos os genes variaram em 100 e 91.69-100%, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Perfis de resistência genotípica e fenotípica das 13 linhagens de *S. Typhimurium* ST313 estudadas

Identificação	Perfil genotípico de resistência (Identidade %)	Perfil fenotípico de resistência
78	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM
220	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP
522	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP-KAN
2366	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP
31217	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP
32714	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP
339	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM- AMP
1880	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-KAN
2081	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP
3956	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM- AMP
4270	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP
5339	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP
1435	<i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>mdtK</i> , <i>emrB</i> , <i>emrR</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP

Fonte: O autor.

SM- Estreptomicina; AMP- Ampicilina e KAN- Canamicina.

Na análise genotípica foi observado apenas genes ligados a bombas de efluxo.

Adicionalmente, foi realizada a pesquisa dos genes de resistência supracitados para a linhagem de referência *S. Typhimurium* str. LT2 no banco de dados *Genbank* e verificou-se a presença dos genes *acrA*, *acrB*, *mdtK*, *emrB*, *emrR* e ausência dos genes *mdsA* e *mdsB*.

5.2. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana

Com base na análise dos resultados dos genes de resistência, foram selecionados 11 antibióticos para o teste fenotípico. Todas as 13 linhagens de *S. Typhimurium* ST313 foram resistentes à estreptomicina, 12 (92, 3%) foram resistentes à ampicilina e apenas 2 (15,4%) foram resistentes à canamicina (Tabela 4). Todas as linhagens foram susceptíveis ao cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, ácido nalidíxico, sulfonamidas, sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacina e colistina.

5.3. Pesquisa de genes do plasmídeo de virulência pSLT

O PlasmidFinder do Center for Genomic Epidemiology nos mostrou o grupo de Incompatibilidade correspondente do plasmídeo de virulência de *Salmonella* (IncFIIIs-pSLT). Ademais, nós utilizamos o BLASTn para confirmarmos a presença do pSLT e o BLASTn foi usado novamente para confirmarmos que os operons *spv* e *pef*, além dos genes *rck* e *mig-5* estavam dentro do pSLT. Foram utilizadas as sequências disponíveis no GenBank do pSLT, operons *spv* e *pef*, genes *rck* e *mig-5* para que essa comparação fosse feita.

Os genes plasmidiais citados acima foram detectados em 12 (92,3%) das 13 linhagens de *S. Typhimurium* estudadas. A porcentagem de cobertura e identidade para todos os genes variou de 100% e 99-100%, respectivamente (**Tabela 6**).

Tabela 6. Características de genes plasmidiais das 13 *S. Typhimurium* ST313 provenientes de sangue humano através do *Virulence Factors Database* (VFDB)

Genes	Proporção de isolados	Função	Cobertura (%)	Identidade (%)
<i>spvA</i>	12/13	proteína de membrana externa	100	100
<i>spvB</i>	12/13	proteína hidrofílica	100	100
<i>spvC</i>	12/13	proteína hidrofílica	100	100
<i>spvD</i>	12/13	proteína hidrofílica	100	99-100
<i>spvR</i>	12/13	regulação do <i>spv</i> operon	100	100
<i>pefA</i>	12/13	subunidade fimbrial maior	100	100
<i>pefB</i>	12/13	proteína reguladora	100	100
<i>pefC</i>	12/13	proteína usher	100	99-100
<i>pefD</i>	12/13	chaperona fimbrial	100	100
<i>rck</i>	12/13	resistência ao sistema complemento	100	100
<i>mig-5</i>	12/13	induzido por macrófagos para anidrase carbônica	100	100

Fonte: O autor.

5.4. Análise Transcriptômica

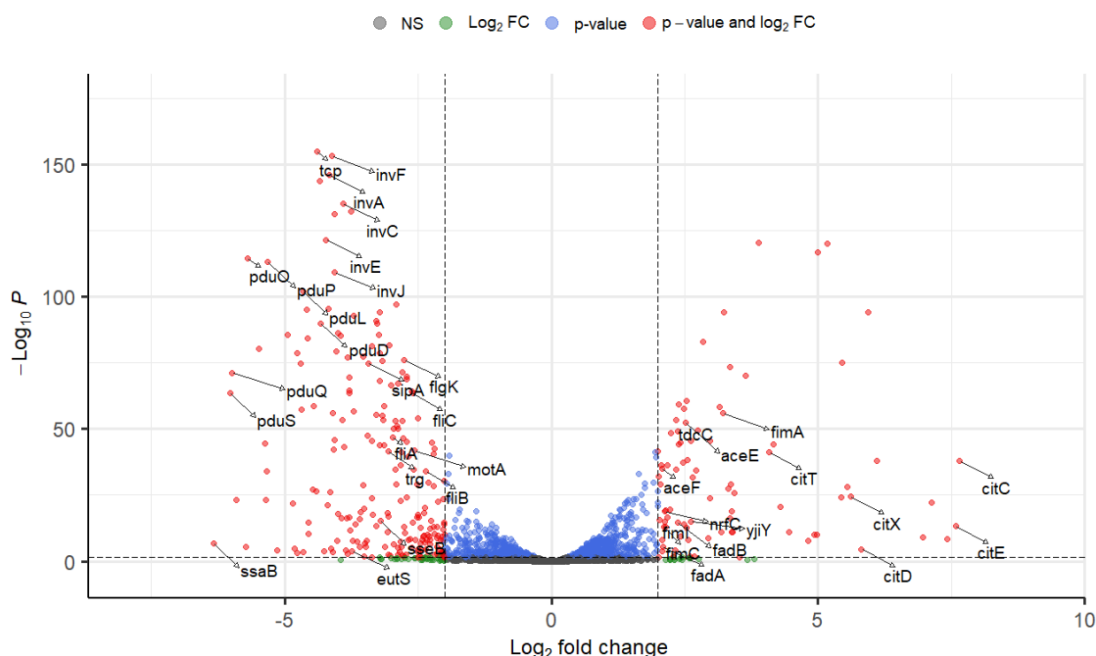
Para ambas as análises do RNAseq, os genes foram selecionados como diferencialmente expressos primeiramente pela significância estatística do teste de FDR (False Discovery Rate) aplicado pelo pacote DESeq2 em linguagem de programação R. O limite utilizado foi *p-value* ajustado menor que 0,1. Após isso os genes foram selecionados de acordo com a diferença de expressão com um valor acima de 4 vezes de diferença para caracterizá-los como significantes. Este último valor foi escolhido para obter maior rigor de seleção, evitando-se efeitos de variáveis cofundadoras (Apêndices 2 e 3).

5.4.1. Análise transcriptômica de *S. Typhimurium* ST313 após o crescimento em LB suplementado com sangue versus LB

O transcriptoma foi realizado sob diferentes condições de crescimento de *S. Typhimurium* ST313 em LB suplementado com 5% de sangue de carneiro e LB a 37°C. Nesta análise apresentou-se 297 genes expressos diferencialmente (83 com aumento de expressão e 214 com redução de expressão) e 4288 sem diferença de expressão.

Após análise e refinamento dos dados, foram selecionados genes importantes para a persistência de *Salmonella* no hospedeiro. Inseridos no processo metabólico do oxiácido, genes relacionados ao metabolismo lipídico apresentaram o aumento de expressão. A via de oxidação de lipídeos é importante para *S. Typhimurium* colonizar nichos extra intestinal e alguns genes dessa via apresentaram aumento de expressão, destacando-se *fadA* 2,09-fold (subunidade do complexo multienzimático de oxidação de ácido graxo) e *fadB* 2,37-fold (subunidade alfa de oxidação de ácido graxo). Quando os lipídeos são a única fonte de carbono, o desvio no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) é necessário para preservar o carbono na incorporação em vias biossintéticas, envolvendo os genes *aceE* 2,52-fold e *aceF* 2,07-fold (piruvato desidrogenase). O citrato está inserido no TCA o que explicaria o aumento de expressão dos genes *citCDET*X (Figura 3).

Figura 3. Volcano plot da expressão relativa entre *S. Typhimurium* ST313 em comparação ao LB suplementado com sangue e LB. Distribuição dos genes de ST313 de acordo com o logFC e *p-value*. Pontos em azul representam os genes que não tiveram sua expressão alterada; pontos em vermelho representam genes com expressão diferencial.

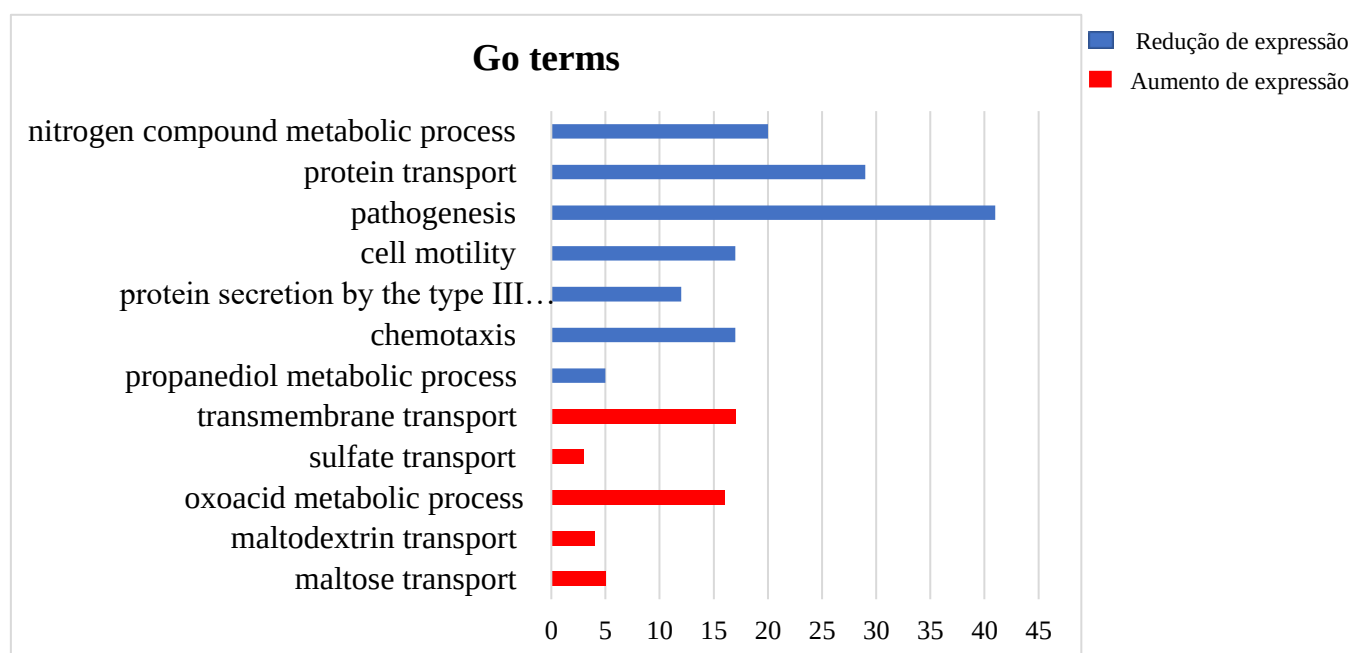


Fonte: O autor.

Nesta condição, genes importantes ligados a patogênese de *S. Typhimurium* apresentaram-se com a diminuição de expressão. Destacam-se os de invasão celular *invJ* (-4,06-fold), *invE* (-4,22-fold), *invC* (-3,9-fold), *invA* (-4,16-fold), *invF* (-4,11-fold) e secreção de proteínas via aparato T3SS *sipA* (-3,43-fold), *sseA* (-5,14-fold), *sseB* (-3,20-fold) e *ssaB* (-6,33-fold). Na motilidade celular, destacam-se os genes *motA* (-2,56-fold), *flgK* (-2,75-fold), *fliA* (-2,8-fold), *fliB* (-2,35-fold) e *fliC* (-2,60-fold). Relacionados com a quimiotaxia, os genes *tcp* -4,4-fold (receptor de sinalização transmembrana) e *trg* -3,05-fold (proteína quimiorreceptora de ribose e galactose). Por fim, o *operon* de utilização do 1,2-propanediol (*pduO,P,L,D,Q,S*) também apresentou diminuição de expressão (**Figura 3**).

Também foi observado diminuição de expressão de genes relacionados ao processo metabólico do composto de nitrogênio, transporte de proteínas, secreção de proteínas pelo T3SS. Por outro lado, o aumento de expressão do transporte transmembrana, transporte de sulfato, transporte de açúcares (maltose e maltodextrina) foi evidenciado (**Figura 4**).

Figura 4. Análise Transcriptômica das principais vias de *S. Typhimurium* ST313 após o crescimento em LB suplementado com 5% de sangue de carneiro em comparação ao LB a 37°C.



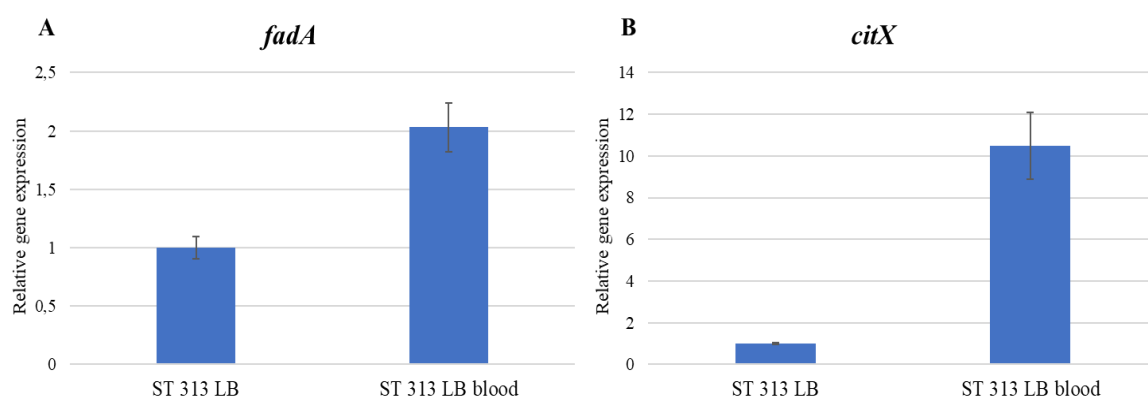
Fonte: O autor.

Figura 4. Análise de enriquecimento (GO terms) da linhagem *S. Typhimurium* ST313 relativa ao crescimento em LB suplementado com sangue e LB. Análise de enriquecimento de acordo com o *score* obtido para cada um dos GO terms. Processos com expressão regulada para cima ilustrados em vermelho, e processos regulados para baixo ilustrados em azul.

5.5. Análise da expressão gênica via qRT-PCR

A técnica de qRT-PCR foi realizada na mesma linhagem de *S. Typhimurium* ST313 522/98 descrita acima para confirmar alvos de interesse obtidos após análise e refinamento dos dados via RNAseq. Entre os alvos analisados estão *fadA* (subunidade do complexo multienzimático de oxidação de ácido graxo) e *citX* (transporte e metabolismo de coenzima; transporte lipídico e metabolismo). A Figura 8 mostra às análises dos genes alvos ligados a via de oxidação de lipídeos.

Figura 5. qRT-PCR dos alvos *fadA* e *citX*



Fonte: O autor.

Figura 5. qRT-PCR dos alvos *fadA* (A) e *citX* (B). A figura mostra a análise feita por $\Delta\Delta C_t$ de *S. Typhimurium* ST313522/98 no meio de crescimento LB em comparação ao LB suplementado com 5% de sangue de carneiro.

O aumento de expressão dos genes alvos *fadA* e *citX* confirmou o observado no RNAseq. O gene *fadA* apresentou-se cerca de duas vezes mais expresso e *citX* cerca de 10 vezes mais expresso no meio LB suplementado com 5% de sangue de carneiro quando comparados aos níveis apenas de LB.

5.6. Checagem da mutagênese via PCR

Análise da checagem da mutagênese dos genes *fadA* e *citX* por PCR em gel de agarose. Podemos observar a diferença em pares de base (pb) dos controles da *S. Typhimurium* ST313 520 (WT) em comparação aos respectivos mutantes.

Figura 6. Checagem da mutagênese via PCR dos alvos *fadA* e *citX*

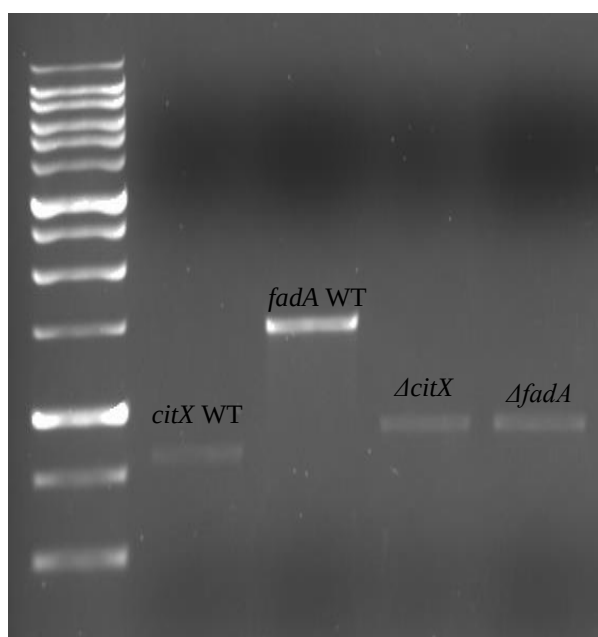
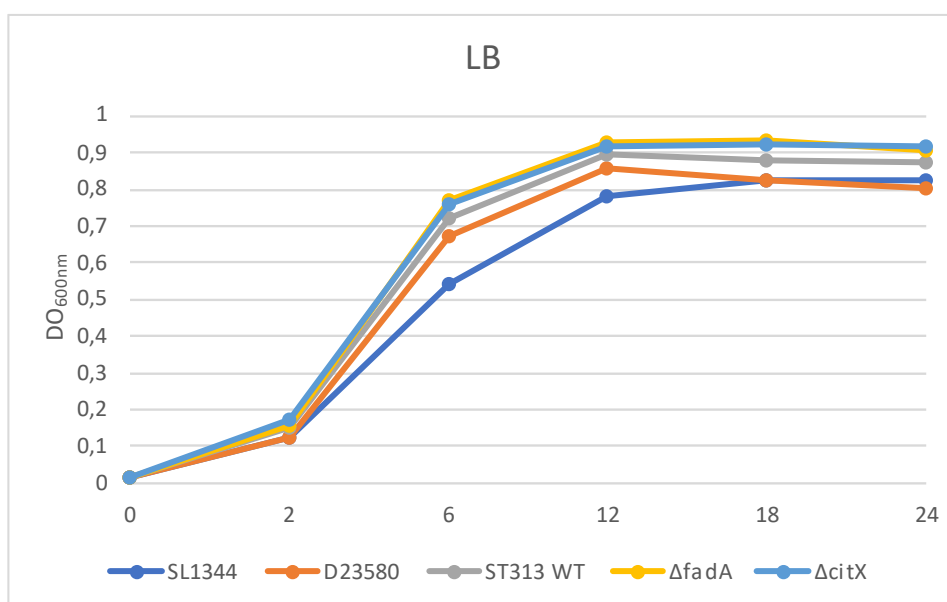


Figura 6. Checagem da mutagênese via PCR em gel de agarose. *citX* WT 813 pb, *fadA* WT 1455 pb, mutantes *citX* 755 pb e *fadA* 780 pb.

Fonte: O autor.

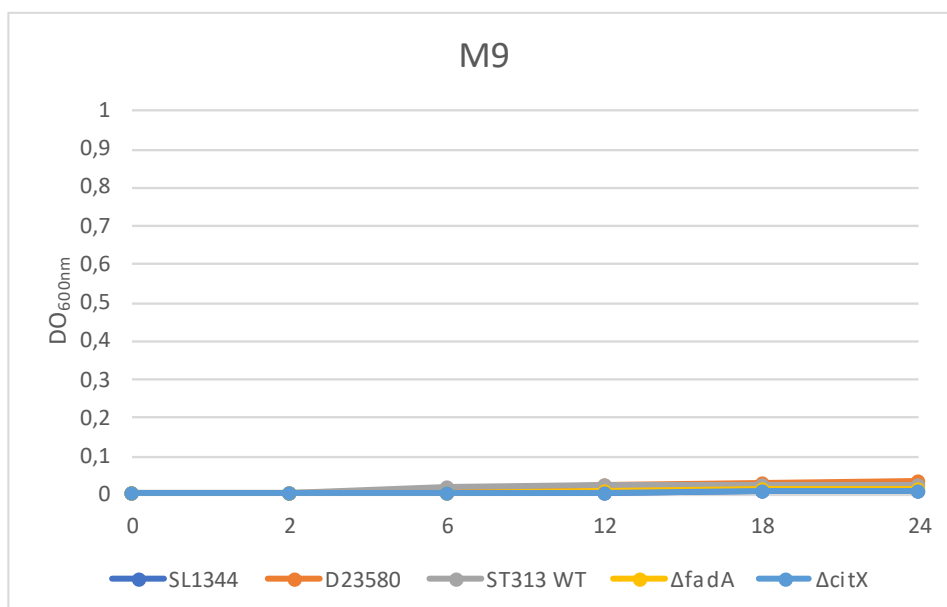
5.7. Curva de crescimento em meios diferenciais

De modo a analisar se os nocautes dos genes *fadA* e *citX* resultariam em algum prejuízo para o crescimento dos mutantes, foram analisadas as curvas de crescimento das linhagens SL1344(ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$. Foi possível observar que nas condições testadas nos meios LB, M9 as curvas foram similares durante o período de crescimento entre as linhagens mutantes para os genes *fadA* e *citX*. No meio M9 suplementado com 0,4% de glicose o $\Delta fadA$ apresentou aumento do crescimento nos períodos 12, 18 e 24 horas com diferença estatística significativa. Por outro lado, o mutante *fadA* apresentou diminuição do crescimento nos períodos 12, 18 e 24 horas com diferença estatística significativa no meio M9 suplementado com 0,1% de ácido oleico.

Figura 7. Curva de crescimento em meio Luria-Bertani

Fonte: O autor.

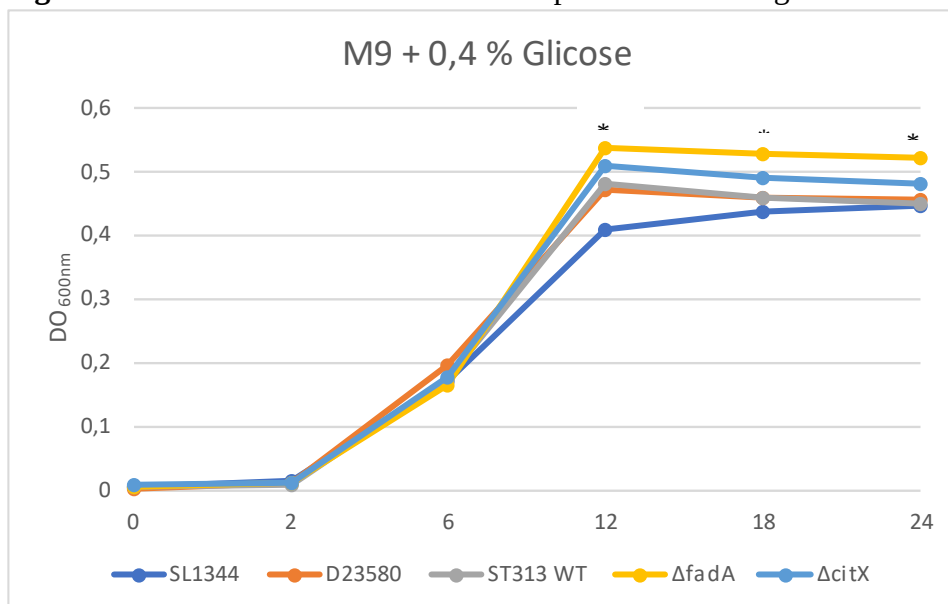
Figura 7. Curva de crescimento das linhagens SL1344 (ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ em meio LB, incubadas por 24 horas e sob agitação ($\cong 143$ rpm). O crescimento foi estimado por D.O. 600_{nm} , não foi observado diferença estatisticamente significativa em comparação a linhagem ST313 WT. $p < 0.05$.

Figura 8. Curva de crescimento em meio M9

Fonte: O autor.

Figura 8. Curva de crescimento das linhagens SL1344 (ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ em meio M9, incubadas por 24 horas e sob agitação ($\cong 143$ rpm). O crescimento foi estimado por D.O. 600_{nm} , não foi observado diferença estatisticamente significativa em comparação a linhagem ST313 WT. $p < 0.05$.

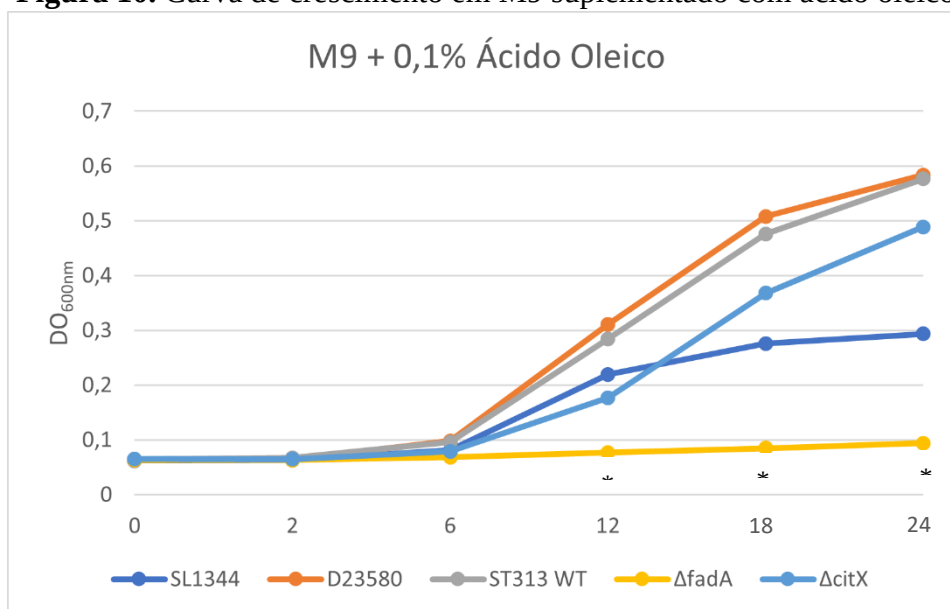
Figura 9. Curva de crescimento em M9 suplementado com glicose.



Fonte: O autor.

Figura 9. Curva de crescimento das linhagens SL1344 (ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ em meio M9 suplementado com 0,4% de glicose, incubadas por 24 horas e sob agitação (≈ 143 rpm). O crescimento foi estimado por D.O. 600nm. Significância estatística em relação a linhagem ST313 WT, $p < 0.05$ (*).

Figura 10. Curva de crescimento em M9 suplementado com ácido oleico



Fonte: O autor.

Figura 10. Curva de crescimento das linhagens SL1344 (ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ em meio M9 suplementado com 0,1% de ácido oleico, incubadas por 24 horas e sob agitação (≈ 143 rpm). O crescimento foi estimado por D.O. 600nm. Significância estatística em relação a linhagem ST313 WT, $p < 0.05$ (*).

5.8. Ensaio de invasão de células HeLa

As linhagens SL1344(ST19), D23580, ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ foram capazes de invadir células HeLa. A ST313 WT apresentou menor índice de invasão quando comparada a linhagem D23580, variando aproximadamente em 1,0 $\log_{10}$ ($p < 0.001$). Por outro lado, $\Delta fadA$ apresentou um índice de invasão com diferença de 0,3 $\log_{10}$ ($p < 0.01$), enquanto para $\Delta citX$ essa diferença foi de 2,0 $\log_{10}$ ($p < 0.0001$) (**Figura 11**).

Figura 11. Ensaio de invasão em células HeLa

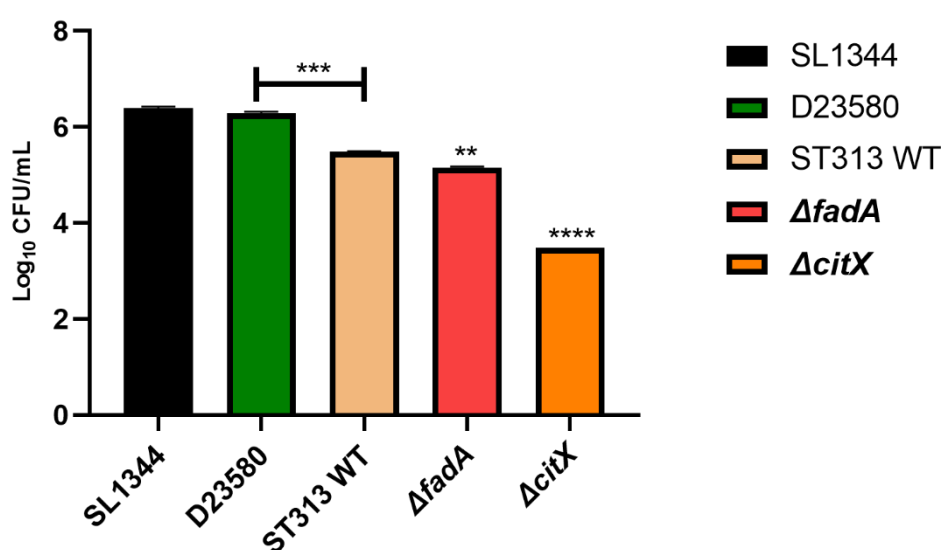


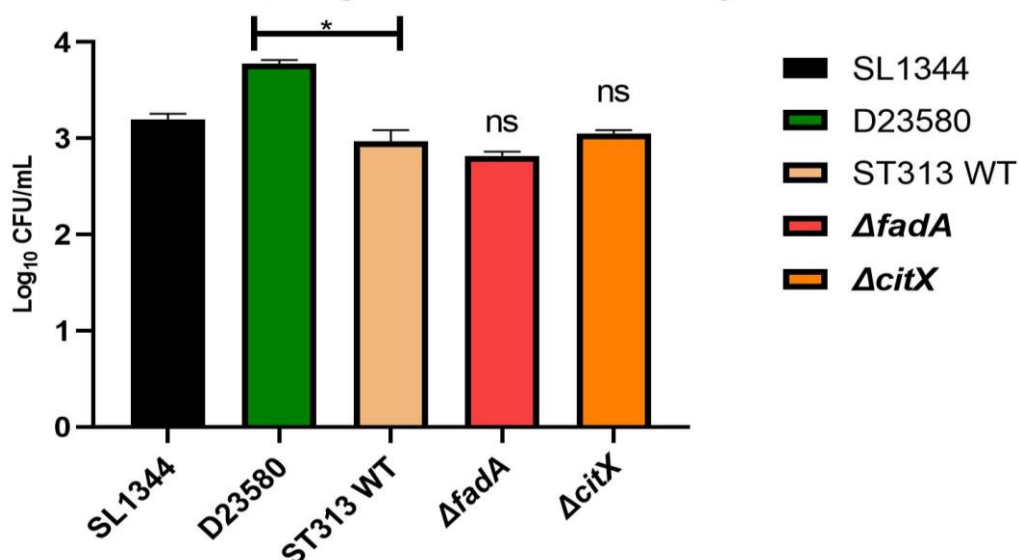
Figura 11. Ensaio de invasão em células HeLa para as linhagens de *S. Typhimurium* SL1344(ST19), D23580, ST313 WT e mutantes *fadA* e *citX*. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

5.9. Ensaio de replicação em macrófagos

A fim de mimetizar o ambiente macrófágico observado em camundongos, foram adicionados aminoácidos não essenciais ao meio de cultura e a ausência de glicose. Embora pertencentes ao mesmo ST313 as linhagens D23580 e ST313 WT apresentam diferença na característica fenotípica da capacidade de replicação em macrófagos. Quando analisados os dados dos experimentos, foi observado que não houve diferença estatística significativa, nas condições testadas, em meio DMEM na presença e ausência de glicose para os mutantes *fadA* e *citX* em comparação a ST313 WT (**Figura 12 e 13**). Em contrapartida, no meio DMEM suplementado com ácido oleico a ST313 selvagem apresentou menor índice de sobrevivência quando comparada a D23580, variando aproximadamente em 1,3 $\log_{10}$. Ademais, observamos diminuição da sobrevivência de $\Delta fadA$ em comparação a ST313

selvagem, variando aproximadamente em $0,4 \log_{10}$ (**Figura 14**). Não houve sobrevivência do mutante *citX* na condição testada.

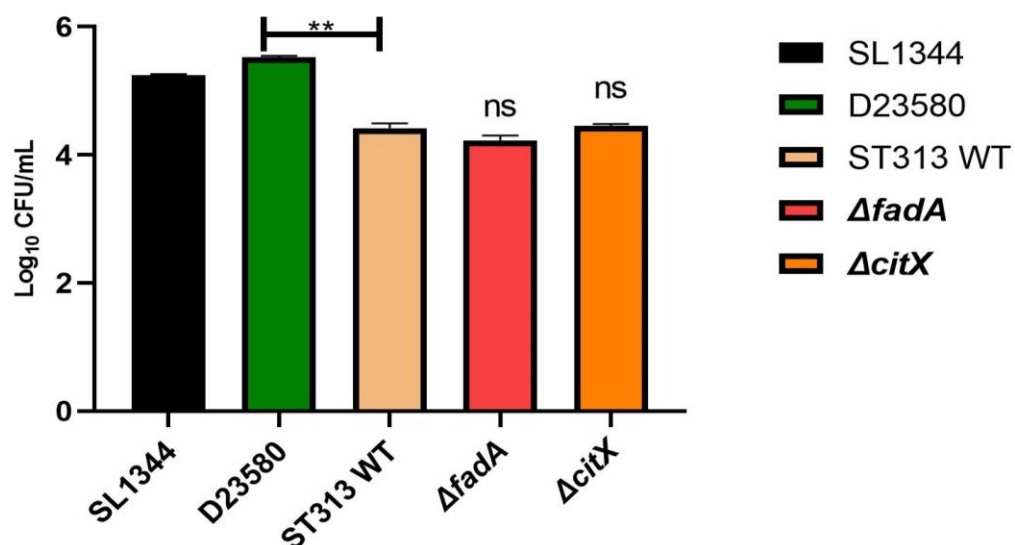
Figura 12. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM sem glicose



Fonte: O autor.

Figura 12. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM sem glicose para as linhagens de *S. Typhimurium* SL1344(ST19), D23580, ST313 WT e mutantes *fadA* e *citX*. * $p < 0.05$.

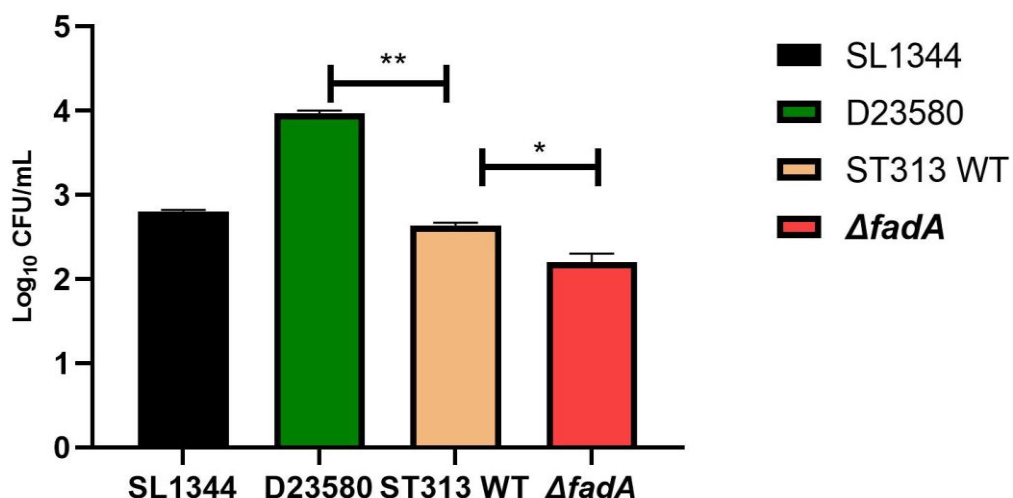
Figura 13. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM com glicose.



Fonte: O autor.

Figura 13. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM com glicose para as linhagens de *S. Typhimurium* SL1344(ST19), D23580, ST313 WT e mutantes *fadA* e *citX*. * $p < 0.01$.

Figura 14. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM com ácido oleico



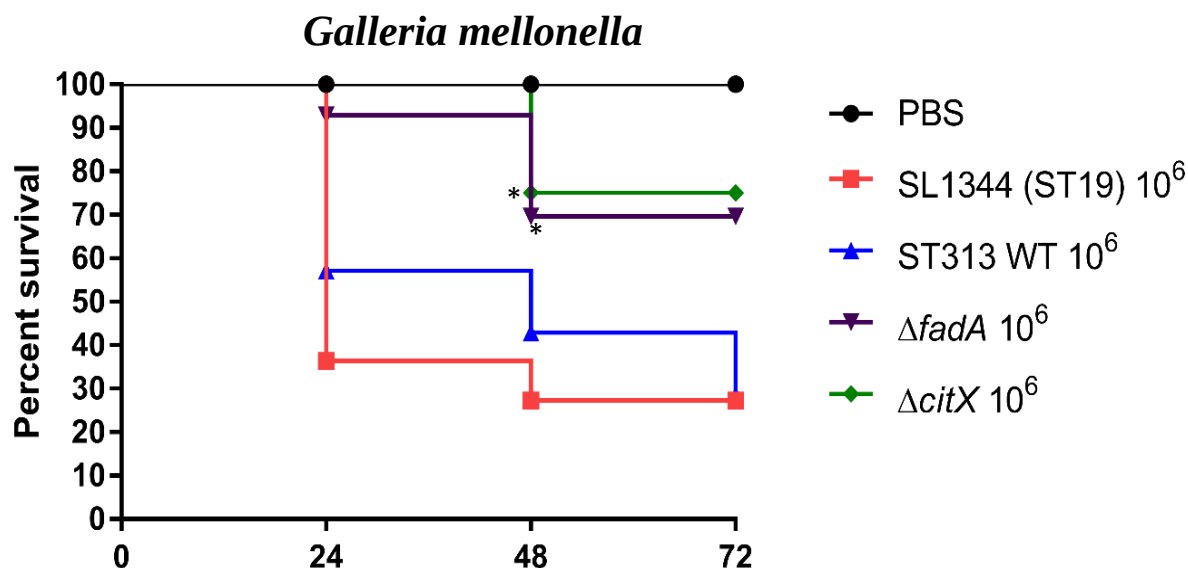
Fonte: O autor.

Figura 14. Ensaio de replicação em macrófagos J774 em meio DMEM com ácido oleico para as linhagens de *S. Typhimurium* SL1344(ST19), D23580, ST313 WT e mutante *fadA*. ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$.

5.10. Mutantes de *S. Typhimurium* ST313 possuem atenuação da virulência em modelo de *Galleria mellonella*

As taxas de mortalidade e sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas a 10^6 UFC com SL1344(ST19), ST313 WT, $\Delta fadA$ e $\Delta citX$ foram observadas durante 24, 48 e 72 horas. Em 24 horas, observou-se sobrevivência de aproximadamente 35% das larvas para a linhagem SL1344(ST19), 57% para ST313 WT, 90% para $\Delta fadA$ e 100% para $\Delta citX$. Como controle, larvas foram inoculadas somente com PBS (**Figura 15**).

Por outro lado, as larvas apresentaram porcentagem de sobrevida de aproximadamente 40% para linhagem ST313 WT no período de 48 horas, enquanto foi observado para as larvas infectadas com os mutantes *fadA* (70%) e *citX* (72%) maior taxa de sobrevida em relação a selvagem. Sugerindo que a mutação em genes correlacionados com a via de oxidação de lipídeos pode atenuar a virulência da *S. Typhimurium* ST313. Em 72 horas foi observado apenas uma morte de *G. mellonella* infectada com a ST313 WT.



Fonte: O autor.

Figura 15. Kaplan-Meier curvas de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* após infecção por SL1344 (ST19), ST313WT, *ΔfadA* e *ΔcitX*. Significância estatística em relação a linhagem ST313 WT, $p < 0.05$ (*).

Na concentração de 10^6 UFC foram visualizadas larvas de cor escura após a infecção para todas as linhagens estudadas. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes, os quais foram obtidos resultados semelhantes.

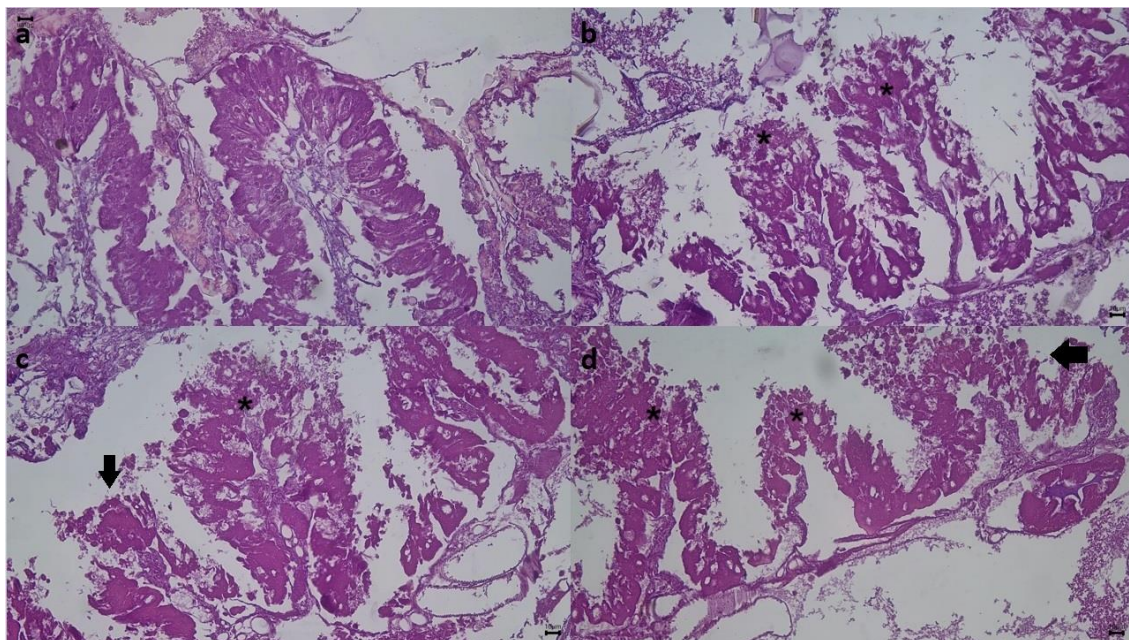
5.11. Análises histopatológicas de *G. mellonella* apresentam diferenças na preservação do tecido intestinal entre linhagem selvagem e mutantes de *Salmonella Typhimurium* ST313.

Para observar as alterações histopatológicas nos tecidos de *G. mellonella* após a inoculação por *S. Typhimurium* foram utilizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente com a concentração de 10^6 UFC/larva. O grupo controle utilizou-se 10 μ L de PBS e cada grupo foi composto por cinco larvas. Neste experimento foram utilizados os tempos 4, 8 e 24 horas pós inoculação. Os experimentos foram realizados em triplicata.

As análises histopatológicas indicaram tecido intestinal bem preservado, com microvilosidades bem definidas, sem alterações estruturais significativas no grupo controle de todos os grupos analisados (Figuras 16a, 17a, 18a e 19a). No período de 4 horas após a inoculação podemos observar áreas de necrose em vilosidades das larvas pertencentes aos grupos inoculados com as linhagens SL1344 (ST19), *ΔfadA* e *ΔcitX* (Figuras 16b, 18b e 19b). Por outro lado, no mesmo período observamos no grupo inoculado com ST313 selvagem não somente áreas de necrose no ápice das vilosidades, mas também vilosidades completamente necrosadas (Figura 17b).

No período de 8 horas pós-inoculação, observamos necrose em vilosidade e atrofia nas linhagens SL1344 (ST19) e ST313 selvagem (Figuras 16c e 17c). Em contrapartida, no mutante *fadA* observamos apenas necrose e no *citX* a atrofia em vilosidades (Figuras 18c e 19c). Em 24 horas pós-inoculação, na linhagem SL1344 (ST19) foi evidenciado áreas de necrose, atrofia e fusão de vilosidades (Figura 16d). No mesmo período no grupo inoculado com a linhagem ST313 selvagem observou-se necrose generalizada da vilosidade com perda total da arquitetura tecidual (Figura 17d). Ademais, no grupo de larvas do mutante *fadA* houve a presença de áreas de necrose atrofia e fusão de vilosidades e no grupo *citX* apenas a atrofia e fusão de vilosidades (Figuras 18d e 19d).

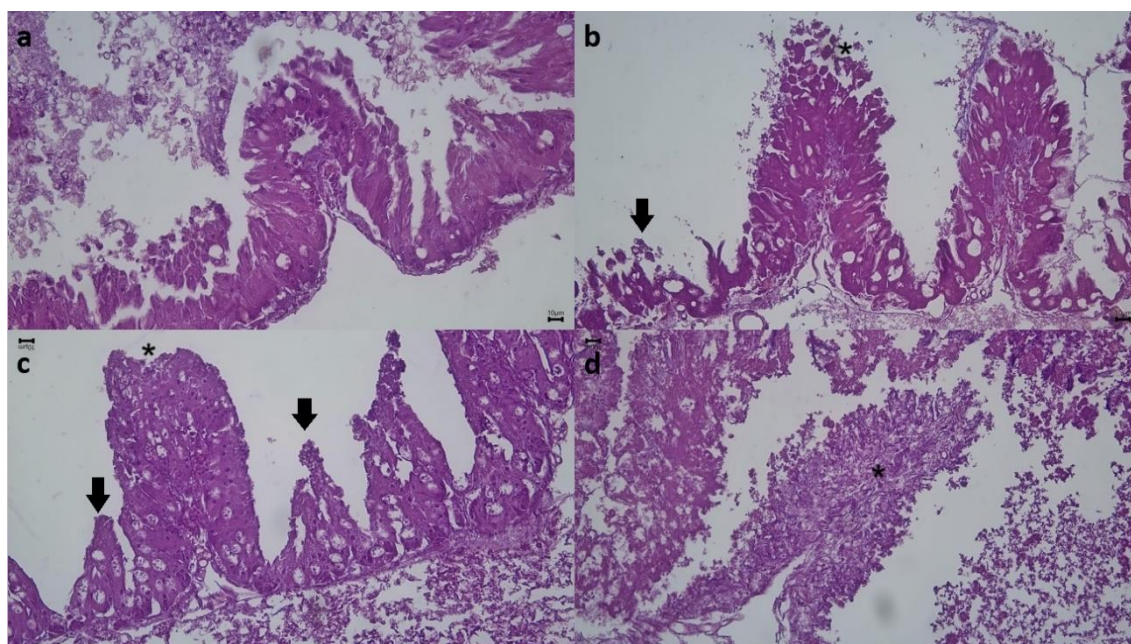
Figura 16. Análise histopatológica do intestino de *G. mellonella* infectada por *S. Typhimurium* SL1344 (ST19).



Fonte: O autor.

Figura 16. Histopatológico intestinal de *G. mellonella* após inoculação com a linhagem de *S. Typhimurium* SL1344 (ST19) em 4, 8 e 24 horas após inoculação (b-d), controle PBS (a). Corte sagital corada com Hematoxilina e Eosina. Necrose (*) e atrofia de vilosidades (seta preta).

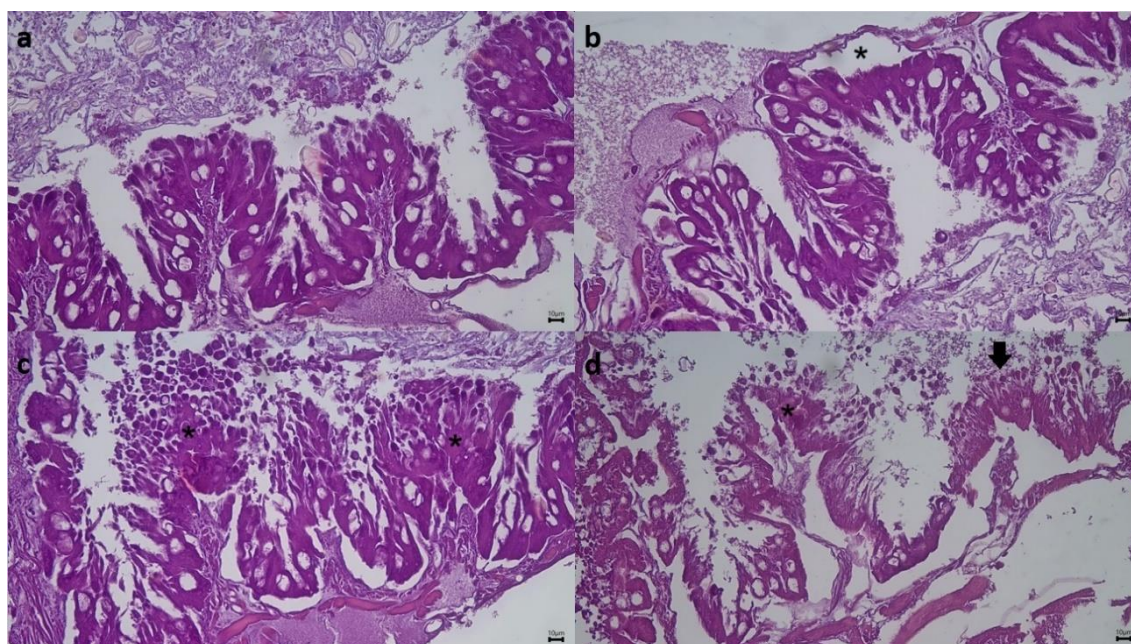
Figura 17. Análise histopatológica do intestino de *G. mellonella* infectada por *S. Typhimurium* ST313 selvagem.



Fonte: O autor.

Figura 17. Histopatológico intestinal de *G. mellonella* após inoculação com a linhagem de *S. Typhimurium* ST313 selvagem em 4, 8 e 24 horas após inoculação (b-d), controle PBS (a). Corte sagital corada com Hematoxilina e Eosina. Necrose do ápice da vilosidade (*), vilosidade completamente necrosada (seta preta).

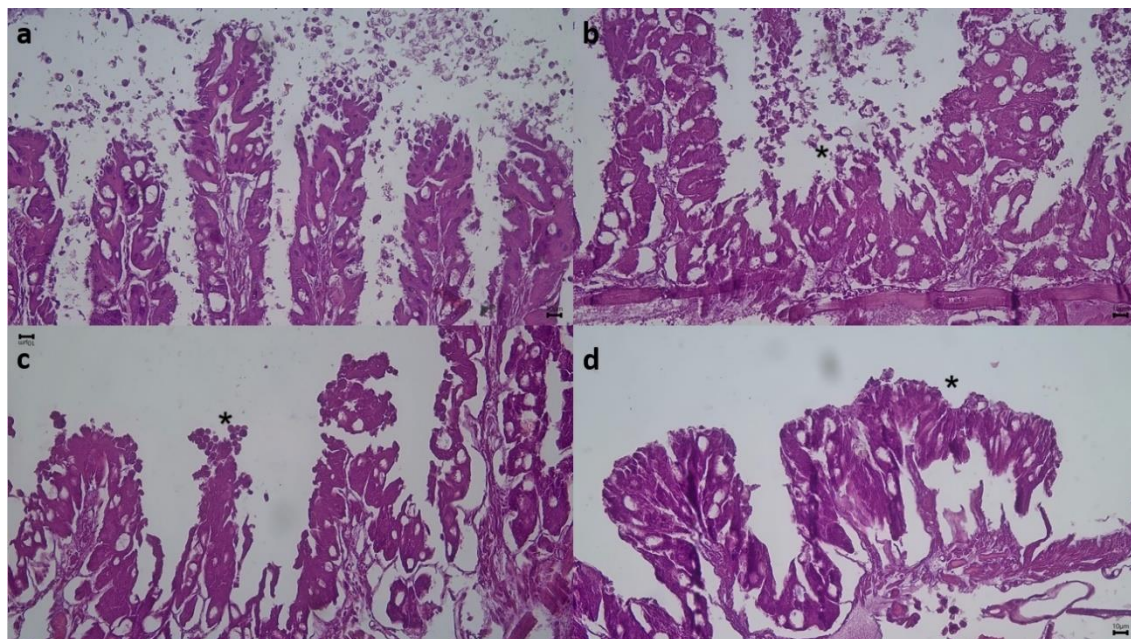
Figura 18. Análise histopatológica do intestino de *G. mellonella* infectada por *S. Typhimurium* ST313 mutante *fadA*.



Fonte: O autor.

Figura 18. Histopatológico intestinal de *G. mellonella* após inoculação com a linhagem de *S. Typhimurium* ST313 $\Delta fadA$ em 4, 8 e 24 horas após inoculação (b-d), controle PBS (a). Corte sagital corada com Hematoxilina e Eosina. Necrose (*), atrofia e fusão de vilosidades (seta preta).

Figura 19. Análise histopatológica do intestino de *G. mellonella* infectada por *S. Typhimurium* ST313 mutante *citX*.



Fonte: O autor.

Figura 19. Histopatológico intestinal de *G. mellonella* após inoculação com a linhagem de *S. Typhimurium* ST313 $\Delta citX$ em 4, 8 e 24 horas após inoculação (b-d), controle PBS (a). Corte sagital corada com Hematoxilina e Eosina. Necrose de vilosidade (*) e atrofia de vilosidades (*).

Nossos dados demonstram a atenuação das lesões no tecido intestinal de *G. mellonella* correlacionado também ao tempo de inoculação dos mutantes *S. Typhimurium* ST313 *fadA* e *citX* em comparação a ST313 selvagem.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, linhagens de *S. Typhimurium* ST313 e a protótipo SL1344 (ST19) foram comparadas diante de testes fenotípicos e transcriptômicos. A partir dos antimicrobianos testados nas 13 linhagens de *S. Typhimurium* ST313 provenientes de hemoculturas humanas, observou-se 100% de resistência à estreptomicina. A estreptomicina não é frequentemente utilizada para tratar infecções causadas por *Salmonella enterica*, porém, tem sido comumente usada como promotor de crescimento em animais de produção, devido a isto, pode ser utilizado como marcador de resistência de linhagens que descolam-se através da cadeia alimentar (MCDERMOTT *et al.*, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2018).

Dentre os antibióticos recomendados para a terapia de infecções por *Salmonella* estão a ampicilina, cefalosporinas, sulfametoxazol-trimetropina e as fluoroquinolonas (FÀBREGA; VILA, 2013). No presente estudo, observamos 12 (92, 3%) das linhagens apresentaram resistência à ampicilina e apenas duas (15,4%) foram resistentes à canamicina.

A resistência antimicrobiana de *S. Typhimurium* nos Estados Unidos tem aumentado nos últimos anos, Wang e colaboradores utilizaram dados do CDC e do *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS) entre 1996 a 2016 de isolados de humanos, animais e carne de varejo para demonstrar o aumento do perfil de resistência à ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (WANG *et al.*, 2019).

Estudo realizado na China, demonstrou que de 294 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de pacientes enfermos entre os anos de 2007 a 2011, 268 (91,16%) foram MDR. Também foi evidenciado grande número de resistência a ampicilina (87,75%), ácido nalidixico (82,65%), sulfametoxazol (89,79%), trimetoprim (71,43%), tetraciclina (89,12%), estreptomicina (78,57%) e cloranfenicol (71,49%) e gentamicina (65, 31%) (SUN *et al.*, 2014).

Tamang e colaboradores (2014) observaram o perfil de resistência das linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de suínos saudáveis e enfermos na Coreia. Das 456 linhagens estudadas, 93,4% apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Os isolados apresentaram frequência de resistência a tetraciclina (85,7%), estreptomicina (83,6%), ácido nalidixico (67,3%), ampicilina (48,3%), cloranfenicol (42,8%) e gentamicina (37,1%). Ademais, foi observada que 69,1% dos isolados eram MDR (TAMANG *et al.*, 2014).

No Brasil, foi observado o perfil de resistência de 553 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de humanos no período entre 1970 a 2008. Do total das amostras, 52% foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado. Além disso, 20,9% apresentaram MDR com resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina (REIS *et al.*, 2011).

Apesar da terapia com antibióticos ser recomendada apenas em casos de pacientes com doença grave ou sinais positivos de doença invasiva, o teste de susceptibilidade a antibióticos pode ser utilizado a fim de tentar obter uma correlação epidemiológica das linhagens isoladas de diferentes fontes e também como um alerta para o risco da circulação de linhagens MDR (CAMPIONI *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014).

A multirresistência de *S. Typhimurium* ST313 assolam o continente Africano, sendo responsável pela alta taxa de mortalidade (20,6%) de pacientes com essa iNTS (UCHE *et al.*, 2017; CANALS *et al.*, 2019). Porém, no Brasil um estudo demonstrou baixa resistência a antimicrobianos nesta pequena amostragem de 9 linhagens de *S. Typhimurium* ST313 provenientes de distintas fontes, sendo 5 linhagens resistentes apenas à sulfonamidas (fezes, sangue humano e alimentos), 1 resistente apenas à estreptomicina (fezes), 1 sulfonamidas e estreptomicina (fezes e alimentos), apenas 1 MDR isolada de fezes humana e 1 apresentou-se susceptível (fezes humanas) aos 12 antimicrobianos testados (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Para todas as linhagens de *S. Typhimurium* ST313 do presente trabalho foram pesquisados genes de resistência pelo *Center for Genomic Epidemiology* e CARD. Não foram encontrados genes de resistência relacionados com a produção de betalactamases por nenhuma das análises feitas, o que está em concordância com os testes fenotípicos de difusão em disco, pois as linhagens foram resistentes a poucos antibióticos.

Por outro lado, genes de resistência relacionados com a produção de bombas de efluxo foram detectados nas linhagens estudadas. Este cenário é alarmante, pois pacientes imunocomprometidos podem apresentar complicações extra-intestinal e desenvolver estados de portadores crônicos, que têm sido implicados a *Salmonella* não tifoidal invasiva (SCHULTZ *et al.*, 2021). As bombas de efluxo são organizadas em estruturas tripartidas abrangendo a largura do envelope da célula gram-negativa e comunicando seletivamente o citoplasma com o ambiente externo (MUNITA; ARIAS, 2016). Entre um dos mais estudados é o sistema AcrAB-TolC, capaz de transportar uma ampla gama de substratos conferindo resistência a vários antibióticos incluindo alguns β -lactâmicos (MUNITA; ARIAS, 2016). Além disso, Buckley *et al.* (2006) demonstrou em *S. Typhimurium* SL1344 que o sistema AcrAB-TolC também pode exercer a capacidade de efluxo de compostos tóxicos do lisossomo, auxiliando na sobrevivência intracelular. Foi observado em mutantes deste sistema a habilidade de adesão e/ou invasão reduzidas (BUCKLEY *et al.*, 2006).

O plasmídeo de virulência de *S. Typhimurium* (pSLT) foi detectado em 12 (92,3%) das 13 linhagens estudadas, carreando o *operon* *spvABCD* e *pefABCD* e os genes *rck* e *mig-5*. O *operon* *spv* tem sido associado a sobrevivência e multiplicação de *Salmonella* spp. em macrófagos hospedeiros (RYCHLIK *et al.*, 2006). Por outro lado, o *operon* *pef* (fímbrias codificadas por plasmídeo) é responsável pela adesão de *Salmonella* spp. ao epitélio intestinal de camundongos recém-nascidos resultando em acúmulo de líquido no lúmen (LEDEBOER *et al.*, 2006). Os genes plasmidiais *rck* e *mig-5* têm sido associados à resistência de *S. Typhimurium* ao sistema complemento do hospedeiro e a neutralização de compostos tóxicos produzidos por macrófagos, respectivamente (RYCHLIK *et al.*, 2006).

É interessante mencionar que um estudo genômico de *S. Typhimurium* ST313 linhagem D23580 isolada no Malawi observou a ausência do pSLT. Entretanto, foi detectada a presença do plasmídeo pSLT-BT que apresenta em sua estrutura o *locus*-Tn21, associado a resistência a antibióticos incluindo cloranfenicol, ampicilina, canamicina, estreptomicina, sulfonamidas e trimetopim, metais pesados e resistência antisséptica (KINGSLEY *et al.*, 2009; SINGLETARY *et al.*, 2016). Estudo realizado por Bakkeren *et al.* (2019) observaram que em modelos de camundongos infectados por *S. Typhimurium* persistente associada à mucosa pode servir como reservatório e espalhar o plasmídeo

portador de resistência a antibióticos de importância clínica. Isso implica que os humanos também podem ter um papel essencial na epidemiologia do iNTS adquirido na comunidade (SCHULTZ *et al.*, 2021).

Nossos dados corroboram com o estudo de Seribelli e colaboradores (2020), sendo que os autores confirmaram a presença do plasmídeo pSLT e operon *spvABCD* e *pefABCD* e os genes *rck* e *mig-5* em todas as linhagens de *S. Typhimurium* ST313 provenientes de humanos e alimentos no Brasil (SERIBELLI *et al.*, 2020). Além disso, Pulford e colaboradores (2021), estudaram clados filogenéticos de genomas de *S. Typhimurium* ST313 isolados no mundo e sua relação com diferentes plasmídeos. Especificamente, as linhagens de *S. Typhimurium* ST313 do presente estudo são geneticamente similares aos isolados do Reino Unido, onde foi encontrada a presença de pSLT e a ausência de pBT1, pBT2 e pBT3 em comparação com as linhagens ST313 L1, L2 e L3 isoladas principalmente da África (MARTINS *et al.*, 2023 sob revisão).

Bacteremia por iNTS causa cerca de 77.500 mortes anuais em todo o mundo, principalmente na África, entre crianças pequenas com malária recente, anemia malárica, ou desnutrição e em adultos acometidos pelo HIV, entre os quais a doença recorrente também é comum (STANAWAYE *et al.*, 2019). Isolados de *S. Typhimurium* ST313 raramente foram relatados fora de África e isolados sanguíneos africanos ST313 são geneticamente distintos de isolados raros de ST313 diarreicos encontrados no Reino Unido ou no Brasil (ACHTMAN *et al.*, 2012; FEASEY *et al.*, 2014; PRECIADO-LLANES *et al.*, 2020).

Embora na América Latina estudos sobre a doença invasiva de *Non-typhoidal Salmonella* sejam escassos, é importante salientar que essa bactéria tem sido o agente mais isolado na África e apresenta taxa de mortalidade em torno de 18 a 25% (GILCHRIST; MACLENNAN, 2019). Um estudo desenvolvido na região rural de Burkina Faso isolou *S. Typhimurium* ST313 de 26 (81,25%) das 32 amostras de sangue oriundas de crianças menores de 15 anos. Também, foi realizado uma pesquisa domiciliar durante a qual amostras de fezes de membros da família, fezes de animais e amostras de água foram e cultivadas. *S. Typhimurium* ST313 foi isolada de apenas um membro da família do total de grupos testados, sugerindo à hipótese de que o intestino humano pode ser reservatório desse sorovar e tipo clonal (POST *et al.*, 2019).

No presente estudo, analisamos o transcriptoma da linhagem *S. Typhimurium* ST313 na comparação entre os meios de crescimento LB suplementado com sangue *versus* LB. Genes utilizados por *Salmonella* spp. encontrados na SPI-1 e codificados pelo T3SS importantes no processo de invasão no hospedeiro e sobrevivência (SPI-2) apresentaram-se com a diminuição de expressão. Estudo de Singletary *et al.* (2016), observaram que em

células HeLa a linhagem Africana D23580 foi aproximadamente três vezes mais invasiva do que a linhagem 14028S, porém a D23580 mutante sem subunidade InvA do Sistema de Secreção do Tipo 3 (T3SS) da SPI-1 não apresentou capacidade de invasiva em células HeLa, evidenciando a importância da SPI-1 T3SS (SINGLETERY *et al.*, 2016).

Além disso, os genes *invJ*, *invE*, *invC*, *invF* estão presentes na SPI-1 e estão relacionados ao anel citoplasmático, complexo ATPase, regulação e translocação do T3SS (DENG *et al.*, 2017). A expressão do gene *sipA* promove a polimerização de actina e desempenha um papel fundamental na entrada bacteriana (SRIKANTH *et al.*, 2011). Também foi descrito que *S. Typhimurium* pode escapar do vacúolo contendo *Salmonella* (SCV), que é mediado principalmente por genes codificados em SPI-1, e se replicar no citosol, um estado chamado hiper- replicativo (KNODLER *et al.*, 2014; SCHULTZ *et al.*, 2021). Neste estágio, SipA é necessária para a replicação citosólica e evita a degradação do SCV nas células HeLa por autofagia, este mecanismo está presente nas células epiteliais intestinais e células imunes do hospedeiro (KNODLER *et al.*, 2014; SCHULTZ *et al.*, 2021). A translocação das proteínas efetoras T3SS pertencentes a SPI-2 de *Salmonella* spp. através do SCV requer a formação de um complexo de translocação que promove a formação de um poro através do qual as proteínas atingem o citoplasma da célula hospedeira. Foi relatado que os genes *sseA*, *sseB* e *ssaB* codificam proteínas que se associam em uma estrutura macromolecular localizada na superfície do SCV (SRIKANTH *et al.*, 2011).

Os genes *fljB*, *fliC*, *motA* e *flgK* apresentaram expressão reduzida nos dados obtidos pelo transcriptoma do presente trabalho. Os genes *fljB* e *fliC* codificam para a flagelina de fase 2 de *S. Typhimurium* e é transcrito juntamente com *fljA*, além disso *motA* está associado ao motor e *flgK* ao gancho flagelar (CONCEIÇÃO *et al.*, 2015; GRAM *et al.*, 2020). A motilidade se destaca em momentos que antecedem o primeiro contato com o epitélio e invasão celular de *S. Typhimurium*, desencadeando resposta inflamatória no hospedeiro (CONCEIÇÃO *et al.*, 2015; GRAM *et al.*, 2020). A diminuição de expressão de genes ligados a motilidade pode estar relacionada com a diminuição da resposta inflamatória relatada o que pode contribuir para o fenótipo furtivo de *S. Typhimurium* ST313 (CANALS *et al.*, 2019).

A motilidade e a quimiotaxia permitem que *S. Typhimurium* migre para polissacarídeos disponíveis durante o processo de fermentação. Alguns genes relacionados com a motilidade mostraram expressão reduzida no presente trabalho, sendo que tal condição também pode estar relacionada com a diminuição de expressão dos genes ligados a quimiotaxia, como *trg* que codifica proteína quimiorreceptora e *tcp* é necessária para que

S. Typhimurium utilize ribose, galactose e metal-citrato, respectivamente (IWAMA *et al.*, 2006; RIVERA-CHAVEZ *et al.*, 2013).

De forma interessante, o *operon* que possui genes para codificar proteínas responsáveis para a utilização do 1,2- propanediol (*pduO,P,L,D,Q,S*) apresentou diminuição de expressão em comparação entre LB suplementado com 5% de sangue de carneiro e LB . O propanediol é gerado pela microbiota intestinal através da fermentação de metil-pentoses, como fucose ou rhamnose durante a inflamação intestinal e permite que *S. Typhimurium* utilize esse produto para evitar a competição nutricional (NUCCIO; BAUMLER, 2014; LANGRIDGE *et al.*, 2015). No entanto, genes ligados ao propanediol são interrompidos nos sorovares de *Salmonella* associados à doença extra intestinal (BADIA *et al.*, 1985; FABER *et al.*, 2017).

Salmonella Typhimurium possui um metabolismo energético diversificado para colonizar novos nichos ativando rotas metabólicas, a fim de sobreviver a ambientes diferenciados (TAYLOR; WINTER, 2020). Em nosso estudo, *S. Typhimurium* ST313 apresentou aumento de expressão de ligados a via de oxidação de lipídeos na comparação entre LB suplementado com 5% de sangue de carneiro *versus* LB.

Sabe-se que *S. Typhimurium* estabelece infecção crônica na maioria das linhagens de camundongos, devido ao fato de sobreviver e replicar em macrófagos por semanas após a infecção (EISELE *et al.*, 2013; REENS *et al.*, 2020; TAYLOR; WINTER, 2020). Os genes de transporte de lipídeos, β -oxidação e desvio do glioxilato são necessários para *S. Typhimurium* replicar-se efetivamente em macrófagos M1 (pró-inflamatório) e se espalhar para locais sistêmicos (REENS *et al.*, 2020; TAYLOR; WINTER, 2020). *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos pulmonares cronicamente infectados utilizam ácidos graxos como importante fonte de carbono e energia no seu metabolismo. O desvio do ciclo do ácido tricarboxílico pode ser essencial para a persistência da tuberculose no modelo murino (MCKINNEY *et al.*, 2000). Também foi observado por Reens e colaboradores (2020) que a oxidação de lipídeos e o desvio de glioxilato foram necessários para a colonização tecidual por *S. Typhimurium*, após inoculação pela via oral-gástrica ou intraperitoneal em camundongos. Ademais, o presente patógeno na ausência de genes ligados ao metabolismo lipídico apresentou-se defeituoso para infecção sistêmica em murinos (REENS *et al.*, 2020).

Resultados transcriptômicos com aumento de expressão de genes ligados a oxidação de lipídeos em *S. Typhimurium* ST313 são inéditos. Neste estudo, o gene *fadA* (enzima de oxidação do ácido graxo) apresentou cerca de 2 vezes mais expressão no meio LB suplementado com 5% de sangue de carneiro quando comparados aos níveis apenas de LB. Este gene desempenha um papel importante na via de oxidação de lipídeos em comparação a

outros genes quando ácidos graxos são usados como única fonte de carbono (YANG; ELZINGA, 1993). *S. Typhimurium* na ausência dos genes *fadAB* apresentou redução da sobrevivência e replicação em cultura primária de macrófagos, e em camundongos houve a atenuação na recuperação bacteriana no fígado e baço (REENS *et al.*, 2020).

O citrato é um intermediário em vias catabólicas e biossintéticas, sendo uma importante molécula regulatória no controle da glicólise e do metabolismo lipídico, fazendo parte do ciclo do ácido tricarboxílico (EWALD *et al.*, 2011). No presente estudo, destacamos o gene *citX* (transporte lipídico e metabolismo), apresentando-se cerca de 10 vezes mais expresso no meio LB suplementado com 5% de sangue de carneiro quando comparado aos níveis apenas de LB. Segundo Utley e colaboradores (1998), *S. Typhimurium* SR-11Fad⁻ mutante incapaz de utilizar ácidos graxos como acetato, citrato e isocitrato como fontes de carbono mostrou-se avirulenta em camundongos BALB/c infectados pela via oral-gástrica nas concentrações de 10⁴ a 10⁹ UFC (UTLEY *et al.*, 1998). Embora a capacidade de utilizar ácidos graxos seja dispensável durante a fase aguda da salmonelose, o desvio do glioxilato pode desempenhar um papel crítico na capacidade de *Salmonella* spp. e outros patógenos intracelulares persistirem em hospedeiros mamíferos (FANG *et al.*, 2005).

Para a análise da exigência de genes do metabolismo lipídico de *S. Typhimurium* ST313, examinamos o crescimento em meios diferenciais. A degradação de ácidos graxos demanda várias etapas, em condição aeróbia observamos que o gene de β -oxidação *fadA* é necessário para o crescimento em ácido oleico como única fonte de carbono, demonstrado pela diminuição do crescimento em comparação a selvagem (REENS *et al.*, 2020). No entanto, nossos dados evidenciaram que a mutação do gene *citX*, via do desvio do glioxilato, não alterou o crescimento em ácido oleico sendo possível levantar a hipótese de que outros genes relacionados ao transporte lipídico possam ter contribuído no crescimento.

Modificações genéticas detectadas nos sorovares iNTS podem envolver uma interação distinta com o hospedeiro: ST313 induz uma resposta intermediária, é mais invasivo e inflamatório que *S. Typhi*, mas menos que *S. Typhimurium* SL1344 (ST19) (CARDEN *et al.*, 2015; RAMACHANDRAN *et al.*, 2015). Estudo células HeLa atribuíram esse fenótipo a uma menor expressão da proteína efetora de *Salmonella* SopE2 e da flagelina *fliC*, o que poderia resultar em menor invasão intestinal e menos respostas inflamatórias devido à ativação do inflamassoma, morte de macrófagos dependentes de caspase-1 e infiltração de neutrófilos (CARDEN *et al.*, 2015). No entanto, nossos dados a ST313 selvagem apresentou menor índice de invasão quando comparada a linhagem D23580.

ST313 pode sobreviver e se replicar dentro de macrófagos humanos e murinos em uma taxa mais alta, disseminados na corrente sanguínea, sendo mais resistente à morte do que a ST19 (RAMACHANDRAN *et al.*, 2015; WEMYSS; PEARSON, 2019). Por mecanismos não totalmente elucidados, ST313 desenvolveu estratégias eficientes para evadir a resposta imune do hospedeiro, que são distintas daquelas exibidas por ST19 e *S. Typhi* (SCHULTZ *et al.*, 2021). Estudo realizado no Brasil demonstrou que todas as 9 linhagens ST313 isoladas de diversas fontes também foram capazes de replicarem-se em macrófagos J774, porém apenas uma apresentou replicação superior aos níveis da SL1344 (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Nos nossos dados observamos alta taxa de replicação em macrófagos J774, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre a *S. Typhimurium* ST313 selvagem em comparação a com os mutantes no meio DMEM sem e com glicose na presença de aminoácidos não essenciais. Não obstante, segundo Reens e colaboradores (2020), a presença de aminoácidos não essenciais no meio de cultura de células e a ausência de glicose altera o metabolismo dos macrófagos e/ou bactérias para mimetizar as condições encontradas em camundongos. Nestas condições, mutantes de *S. Typhimurium* utilizaram genes do desvio do glioxilato para se replicar/sobreviver na ausência de glicose (REENS *et al.*, 2020). Ademais, no presente estudo o mutante *fadA* apresentou diminuição da replicação comparado com a selvagem no meio suplementado com ácido oleico. É importante salientar que este é o primeiro trabalho que avalia a resposta da *S. Typhimurium* ST313 e seus respectivos mutantes ao metabolismo lipídico na presença de meios diferenciais.

G. mellonella é um modelo alternativo frequentemente utilizado em ensaios de virulência de diversos microrganismos patogênicos (RAMARAO *et al.*, 2012). O modelo consiste em colônias de larvas de *G. mellonella* que são facilmente cultivadas em grande número e baixo custo e produzem componentes da resposta imune inata semelhantes aos humanos (SCORZONI *et al.*, 2015). Estudo recente do nosso grupo, evidenciou no período de 24 horas altas taxas de mortalidade de larvas de *G. mellonella* infectadas com *S. Typhimurium* SL1433 (ST19) e ST313 nas concentrações de 10^8 UFC. Por outro lado, não foi observado mortes nas larvas inoculadas com a concentração de 10^4 UFC de SL1344 (ST19) ou ST313 e o número crescente de larvas de cor escura e/ou mortas foi obtido de maneira dose-dependente (MARTINS *et al.*, 2023 sob revisão).

No presente estudo, verificou importante atenuação da virulência dos mutantes *fadA* e *citX* principalmente no período de 48 horas no ensaio de sobrevivência, quando comparadas com a linhagem selvagem no modelo alternativo estudado. As observações histopatológicas de *G. mellonella*, demonstraram também que as larvas inoculadas com a

linhagem ST313 selvagem demonstraram maior injúria do tecido intestinal em comparação aos mutantes *fadA* e *citX* principalmente no período de 24 horas após a inoculação. Nossos resultados corroboram com os dados encontrados no ensaio de sobrevivência do presente trabalho. Experimentos de infecção em camundongos com mutantes de *S. Typhimurium* por genes de enzimas da via canônica da β -oxidação (*fadAB*) demonstraram atenuação da virulência, ressaltando a importância desta via para a colonização tecidual (REENS *et al.*, 2020). No mesmo estudo, foi avaliado que mutantes da via do desvio do glioxilato foram superados pelo tipo selvagem em múltiplos tecidos em camundongos, sugerindo que os lipídeos são uma importante fonte de carbono disponível para *S. Typhimurium* durante a infecção (REENS *et al.*, 2020). Esses resultados replicam-se quando falamos do modelo de *G. mellonella*, já que nossos dados evidenciaram que mutações em genes correlacionados com o metabolismo lipídico podem atenuar a virulência da *S. Typhimurium* ST313.

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, demostramos 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 genome**, 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* persisters 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 β -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.

SINGLETARY, 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.

MATERIAL SUPLEMENTAR 1

Nome do isolado	Perfil genotípico de resistência (Identidade %)	Perfil fenotípico de resistência	Presença de plasmídeo (pSLT)
78	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM	ausente
220	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP	presente
522	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP-KAN	presente
2366	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP	presente
31217	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP	presente
32714	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP	presente
339	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM- AMP	presente
1880	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-KAN	presente
2081	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP	presente
3956	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM- AMP	presente
4270	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP	presente
5339	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP	presente
1435	<i>acrA, acrB, mdtK, emrB, emrR, mdsA, mdsB</i> (91.69-100%)	SM-AMP	presente

APÊNDICE 1

Características do sequenciamento das 13 linhagens de *S. Typhimuirum* ST313 utilizadas no estudo.

Barcode	Strain name	Coverage	Abundance (Minikraken)	Assembly - length	Assembly - contigs	Assembly - N50	Predicted sequence type
FD01848810	78/98	28,9584	99,83	4681000	83	121898	313
FD01848812	220/98	40,9148	99,55	4907702	107	176042	313
FD01848813	522/98	24,7883	99,73	4882862	79	149303	313
FD01848818	2366/98	16,9884	99,71	4861866	142	61385	313
FD01848828	31217/04	31,0698	99,78	4857945	62	175742	313
FD01848833	32714/04	19,192	99,61	4819578	83	147078	313
FD01848836	339/07	23,5184	99,74	4897372	74	175613	313
FD01848843	1880/08	26,836	99,85	4857742	72	175909	313
FD01848844	2081/08	109,138	99,6	4870033	82	225559	313
FD01848852	3956/10	38,6607	99,67	4870357	103	175877	313
FD01848853	4270/10	39,1827	99,72	4827828	78	216033	313
FD01848858	5339/10	15,2328	99,62	4811165	170	46563	313
FD01848859	1435/11	19,6245	99,72	4841714	92	114591	313

APÊNDICE 2

Lista de genes com expressão diferencial obtidos via análise transcriptômica de *S. Typhimurium* ST313 em comparação a ST19 (SL1344). Os genes foram selecionados de acordo com a diferença de expressão com um valor acima de 4 vezes de diferença para caracterizá-los como significantes. Este último valor foi escolhido para obter maior rigor de seleção, evitando-se efeitos de variáveis co-fundadoras.

GENE	POSSÍVEL FUNÇÃO	logFC
DOWNREGULATED		
<i>allB</i>	Allantoinase	-8,756
<i>pagK</i>	PhoPQ-activated protein	-7,764
<i>ydiV</i>	Anti-FlhC(2)FlhD(4) fator YdiV	-7,608
<i>pagO</i>	Protein PagO	-6,072
<i>melA</i>	Alpha-galactosidase	-5,812
<i>napB</i>	Periplasmic nitrate reductase, electron transfer subunit	-5,347
<i>bfd</i>	Bacterioferritin-associated ferredoxin	-5,173
<i>rbsA</i>	Ribose import ATP-binding protein RbsA	-4,948
<i>rbsC</i>	D-ribose high-affinity transport protein (1st module, ATP-binding subunit)	-4,815
<i>rbsD</i>	D-ribose pyranase	-4,662
<i>napC</i>	Cytochrome c-type protein	-4,368
<i>proW</i>	Glycinebetaine/prolinebetaine transport system permease protein ProW	-4,259
<i>proV</i>	Glycinebetaine/prolinebetaine transport system ATP-binding protein ProV	-4,181
<i>napA</i>	Periplasmic nitrate reductase	-4,156
<i>glgS</i>	Surface composition regulator	-3,842
<i>melB</i>	Melibiose carrier protein	-3,600
<i>stfF</i>	Fimbrial domain-containing protein	-3,590
<i>ssaD</i>	Yop-YscD_ppl domain-containing protein	-3,510
<i>yjfJ</i>	Putative phage hock protein A	-3,333
<i>zraP</i>	Zinc resistance-associated protein	-3,195
<i>ssaE</i>	Secretion system effector	-2,736
<i>infA</i>	Translation initiation factor IF-1	-2,622
<i>sodA</i>	Superoxide dismutase [Mn]	-2,519
<i>tdcD</i>	Propionate kinase	-2,399
<i>yjeI</i>	Putative outer membrane lipoprotein	-2,372
<i>fimH</i>	Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin	-2,352
<i>csgG</i>	Curli production assembly/transport component CsgG	-2,383
<i>cspD</i>	Cold shock-like protein CspD	-2,240
<i>glxK</i>	Glycerate kinase II	-2,190
<i>lspA</i>	Lipoprotein signal peptidase	-2,131
<i>torR</i>	Response regulator in multi-component regulatory system with TorS (Sensory kinase) and TorT (Periplasmic sensor)	-2,146
<i>hcr</i>	NADH oxidoreductase for hcp gene product	-2,107
<i>metB</i>	Cystathionine gamma-synthase	-2,043
<i>ccdA</i>	Toxin addiction system: antidote	-2,040
<i>yidQ</i>	Putative outer membrane lipoprotein	-2,019
UPREGULATED		
<i>sseJ</i>	Secreted effector protein SseJ	2,017
<i>pduT</i>	Propanediol utilization protein	2,020
<i>pipB</i>	Secreted effector protein PipB	2,103

<i>pduD</i>	Propanediol dehydratase medium subunit	2,225
<i>pduJ</i>	BMC domain-containing protein	2,294
<i>osmY</i>	Hyper osmotically inducible periplasmic protein	2,307
<i>eutA</i>	Ethanolamine utilization protein EutA	2,425
<i>lysA</i>	Diaminopimelate decarboxylase	2,450
<i>ybaY</i>	Glycoprotein/polysaccharide metabolism	2,478
<i>otsB</i>	Trehalose-phosphatephosphatase	2,517
<i>fliB</i>	Lysine-N-methylase	2,564
<i>ssaT</i>	Secretion system apparatus protein SsaT	2,603
<i>pduU</i>	Propanediol utilization protein PduU	2,607
<i>fliC</i>	Flagellin	2,611
<i>pduE</i>	Propanediol dehydratase small subunit	2,684
<i>pduV</i>	Propanediol utilization protein PduV	2,798
<i>steC</i>	Secreted effector kinase SteC	2,805
<i>sifB</i>	Secreted effector protein SifB	2,905
<i>eutM</i>	Ethanolamine utilization protein EutM	2,941
<i>pspB</i>	Phage shock protein	2,991
<i>pduP</i>	Aldedh domain-containing protein	3,035
<i>spvA</i>	<i>Salmonella</i> plasmid virulence: outer membrane protein	3,092
<i>ssaK</i>	Secretion system apparatus protein SsaK	3,191
<i>ssaJ</i>	Secretion system apparatus lipoprotein SsaJ	3,258
<i>spvC</i>	MAPK phospho threoninylase	3,340
<i>treA</i>	Periplasmic trehalase	3,440
<i>ssaM</i>	Secretion system apparatus protein SsaM	3,370
<i>sopD2</i>	Secreted effector protein sopD2	3,644
<i>pduS</i>	Propanediol utilization protein	3,670
<i>osmC</i>	Putative resistance protein	3,811
<i>pduO</i>	Corrinoid adenosyl transferase	3,827
<i>katE</i>	Catalase	3,847
<i>ssaG</i>	Secretion system apparatus	3,927
<i>eutT</i>	Ethanolamine utilization cobalamin adenosyl transferase	4,167
<i>pduN</i>	Propanediol utilization protein	4,169
<i>sseL</i>	Deubiquitinase SseL	4,553
<i>ssaI</i>	Secretion system apparatus	4,545
<i>ssaI</i>	EscI/YscI/HrpBfamilytype III secretion system innerrod protein	4,545
<i>ssaB</i>	Pathogenicity island chaperone protein SpiC	5,200

Fonte: O autor.

APÊNDICE 3

Lista de genes com expressão diferencial obtidos via análise transcriptômica de *S. Typhimurium* ST313 em meio LB comparado ao LB suplementado com sangue. os genes foram selecionados de acordo com a diferença de expressão com um valor acima de 4 vezes de diferença para caracterizá-los como significantes. Este último valor foi escolhido para obter maior rigor de seleção, evitando-se efeitos de variáveis co-fundadoras.

Gene	Possível Função	logFC
DOWNREGULATED		
<i>pduS</i>	Propanediol utilization protein	-6,02967
<i>pduT</i>	Propanediol utilization protein	-5,90517
<i>pduO</i>	Corrinoid adenosyl transferase	-5,69867
<i>pduM</i>	Propanediol utilization protein	-5,36756
<i>pduV</i>	Propanediol utilization protein PduV	-5,3502
<i>pduP</i>	Aldedhdomain-containing protein	-5,32511
<i>pduW</i>	Probable propionate kinase	-4,7018
<i>ssaH</i>	Secretion system apparatus	-4,66187
<i>pduL</i>	Phosphate propanoyl transferase	-4,66086
<i>pduE</i>	Propanediol dehydratase small subunit	-4,59543
<i>pduU</i>	Propanediol utilization protein PduU	-4,47809
<i>pduK</i>	BMC domain-containing protein	-4,45219
<i>tcp</i>	Methyl-accepting chemotaxis citrate transducer	-4,39587
<i>pduD</i>	Propanediol dehydratase medium subunit	-4,32882
<i>ssaG</i>	Secretion system apparatus	-4,25699
<i>invE</i>	Invasion protein InvE	-4,22853
<i>invA</i>	Invasion protein InvA	-4,1641
<i>ssaT</i>	Secretion system apparatus protein SsaT	-4,13966
<i>invF</i>	Invasion protein InvF	-4,11403
<i>invB</i>	Surface presentation of antigens protein SpaK	-4,03786
<i>pduC</i>	Propanediol dehydratase large subunit	-3,99629
<i>invC</i>	Probable ATP synthase SpaL	-3,90611
<i>sseJ</i>	Secreted effector protein SseJ	-3,85617
<i>sifB</i>	Secreted effector protein SifB	-3,82866
<i>ssaJ</i>	Secretion system apparatus lipoprotein SsaJ	-3,79004
<i>pduF</i>	Propanediol diffusion facilitator	-3,7028
<i>sseD</i>	Secreted effector protein SseD	-3,64159
<i>pipB</i>	Secreted effector protein PipB	-3,51453
<i>ssaM</i>	Secretion system apparatus protein SsaM	-3,48238
<i>invH</i>	Type 3 secretion system pilotin	-3,45098
<i>sipA</i>	Cell invasion protein SipA	-3,43369
<i>fljB</i>	Phase 2 flagellin	-3,3653
<i>sopE2</i>	Guanine nucleotide exchange factor <i>sopE2</i>	-3,35828
<i>cheR</i>	Chemotaxis protein methyl transferase	-3,27954
<i>sseB</i>	Enhances serine sensitivity	-3,20693
<i>sseB</i>	Secreted effector protein SseB	-3,20693
<i>sseC</i>	Secreted effector protein SseC	-3,06486
<i>trg</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein III	-3,05868
<i>motB</i>	Motility protein B	-3,01437
<i>fliA</i>	RNA polymerase sigma factor FliA	-2,97295

<i>cheW</i>	Chemotaxis protein CheW	-2,91837
<i>cheY</i>	Chemotaxis protein CheY	-2,8299
<i>ssaK</i>	Secretion system apparatus protein SsaK	-2,82443
<i>ssaD</i>	Yop-YscD_ppl domain-containing protein	-2,81789
<i>tsr</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein I	-2,79684
<i>ssaE</i>	Secretion system effector	-2,78918
<i>flgK</i>	Flagellar hook-associated protein 1	-2,75881
<i>ssaL</i>	Secretion system apparatus protein SsaL	-2,74237
<i>fliK</i>	Flagellar hook-length control protein	-2,72197
<i>sipC</i>	Cell invasion protein SipC	-2,61883
<i>fliC</i>	Flagellin	-2,60672
<i>pipC</i>	Chaperone protein SigE	-2,58931
<i>motA</i>	Motility protein A	-2,56309
<i>sseF</i>	Secretion system effector	-2,49659
<i>fliB</i>	Lysine-N-methylase	-2,34941
<i>fliF</i>	Flagellar M-ring protein	-2,27634
<i>sopB</i>	Inositol phosphate phosphatase SopB	-2,23801
<i>pipA</i>	Pathogenicity island encoded protein: SPI5	-2,21513
<i>fliM</i>	Flagellar motor switch protein FliM	-2,01582
UPREGULATED		
<i>fimI</i>	Fimbrin-like protein FimI	2,031402
<i>aceF</i>	Acetyl transferase componente of pyruvate dehydrogenase complex	2,070102
<i>fadA</i>	3-ketoacyl-CoA thiolase	2,090209
<i>nrfC</i>	Putative formate-dependent nitrite reductase	2,125157
<i>malS</i>	Aamy domain-containing protein	2,134132
<i>pyrE</i>	Orotate phosphoribosyl transferase	2,329297
<i>fadB</i>	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	2,370968
<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component	2,525448
<i>cadB</i>	APC Family lysine/cadaverine transport protein	2,646026
<i>malG</i>	Maltose/maltodextrintransport system permeasse protein MalG	2,977296
<i>malM</i>	Maltose operon periplasmic protein	3,151843
<i>fimA</i>	Type-1 fimbrial protein, A chain	3,222655
<i>malE</i>	Maltose/maltodextrin-binding periplasmic protein	3,236944
<i>malF</i>	Maltose/maltodextrin transport system permeasse protein MalF	3,64312
<i>malK</i>	Maltose/maltodextrin import ATP-binding protein MalK	3,893762
<i>citT</i>	DASS family, citrate:succinate transport (Antiport) protein	4,085507
<i>narI</i>	Nitrate_red_gamdomain-containing protein	4,456335
<i>narJ</i>	Nitrate reductase 1, delta subunit	4,936662
<i>narH</i>	Nitrate reductase 1, FeS (Beta) subunit	4,981523
<i>sodA</i>	Superoxide dismutase [Mn]	5,000651
<i>citX</i>	Apo-citrate lyase phosphoribosyl-dephospho-CoA transferase	5,61439
<i>citD</i>	Citrate lyase acylcarrier protein 1	5,812602
<i>narK</i>	Nitrate/nitrite transporter	7,126047
<i>citE</i>	Citrate (pro-3S)-lyase subunit beta	7,582634
<i>citC</i>	Citrate-sodiumsymporter	7,659144
<i>citC</i>	[Citrate [pro-3S]-lyase] ligase	7,659144

Fonte: O autor.