



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia

LUANA DE SALES LEITE

**Análise do efeito de VisP no transcriptoma e patogenicidade
de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**

Araraquara - SP

2021

LUANA DE SALES LEITE

Análise do efeito de VisP no transcriptoma e patogenicidade de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre, área de pesquisa em Bacteriologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Santos Braz

Araraquara - SP

2021

L533a Leite, Luana de Sales.
Análise do efeito de VisP no transcriptoma e patogenicidade de
Salmonella enterica sorovar Typhimurium / Luana de Sales Leite. –
Araraquara: [S.n.], 2021.
74 f. : il.

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

Orientadora: Cristiano Gallina Moreira.
Coorientadora: Vânia Santos Braz.

1. *S. Typhimurium*. 2. Patogenicidade. 3. Transcriptoma. 4. VisP. 5. 1,2 propanodiol. I. Moreira, Cristiano Gallina, orient. II. Braz, Vânia Santos, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise do efeito de VisP no transcriptoma e patogenicidade de Salmonella enterica sorovar Typhimurium

AUTORA: LUANA DE SALES LEITE

ORIENTADOR: CRISTIANO GALLINA MOREIRA

COORIENTADORA: VÂNIA SANTOS BRAZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS 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 de Araraquara – UNESP

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

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP

Araraquara, 26 de março de 2021

Dedico esse trabalho à minha mãe (In memoriam), como reconhecimento por tudo o que fez por mim durante sua vida, todos os seus esforços para que eu conquistasse meus sonhos e conseguisse alcançar meus objetivos. Mesmo não estando presente na conclusão desse trabalho, estive no início dessa minha jornada me apoiando e torcendo por mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por todo apoio e incentivo dedicados a mim. Por você, com sua força e sua memória, concluí essa etapa da minha vida da melhor maneira possível, como você sempre me ensinou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira por todo auxílio, incentivo e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora Dra Vânia Santos Braz, por toda paciência, dedicação e ensinamentos, fundamentais para que eu pudesse encerrar esse trabalho da melhor maneira possível.

À toda equipe do Laboratório PASIQUIBAC pela cooperação sempre que necessário e por todos os momentos de descontração que sempre tornava os dias de trabalho mais leves e felizes. Em especial ao Patrick, o qual sem a ajuda nenhuma etapa desse trabalho teria se concretizado.

Ao apoio técnico da Mariana Santoni, essencial para a realização da técnica de RNAseq realizada durante esse estudo e resolução de problemas que surgiram durante esse período.

À FCFar/UNESP, à FAPESP e à CAPES pelo apoio institucional e financeiro que viabilizaram a realização deste projeto.

E, aos meus familiares e amigos por todo suporte, apoio e encorajamento.

A todos que contribuíram ou me apoiaram de alguma forma, minha gratidão!

RESUMO

As espécies de *Salmonella* são as que mais causam doenças de origem alimentar no mundo sendo uma das principais causas bacterianas de gastroenterite. *S. Typhimurium* é comumente utilizada para estudo de interações com células hospedeira, pois bactérias intestinais são extremamente eficientes em orquestrar uma comunicação intraespecíficas e interespecíficas, através de complexos sistemas de sinalização química. Estudos mostram a importância da proteína VisP no periplasma da célula bacteriana, integrando os cuidados com a homeostase da membrana, aos processos de virulência bacteriana e resposta ao estresse em *S. Typhimurium*. O intestino possui uma densa e diversificada microbiota, além de uma ampla variedade de nutrientes. A microbiota intestinal possui a capacidade de disponibilizar diferentes açúcares através de atividade enzimática, assim como outros tipos de metabólitos. A exploração desses subprodutos derivados da microbiota como nutrientes e outros sinais é crucial para o sucesso da infecção por patógenos entéricos. Portanto, o presente estudo buscou elucidar o papel que VisP poderia desempenhar na virulência de *S. Typhimurium* e a sua relação com a expressão de outros genes, como os relacionados a vias metabólicas envolvidas no processo de infecção por esse patógeno. Para tanto, foi realizado o estudo do padrão de expressão gênica para definir a influência de açúcares na regulação do operon *visP/ygiV* e também ensaios fenótipos em diferentes condições. Os resultados obtidos indicam que o operon *visP/ygiV* possa sofrer influência de alguns açúcares na sua regulação. O transcriptoma da linhagem mutante $\Delta visP$ foi obtido através da técnica de RNAseq, o que demonstrou a importância dessa proteína para *S. Typhimurium*, visto grande número de transcritos diferencialmente expressos comparados à linhagem selvagem. Ensaios de expressão gênica e fenotípicos foram realizados em diferentes condições (disponibilidade de nutrientes e oxigênio), afim de relacionar a ausência de VisP com a redução na expressão de genes relacionados ao mecanismo de invasão e metabolismo de 1,2 propanodiol. Os resultados mostram que a mudança na disponibilidade de nutriente e oxigênio altera o padrão de expressão de ambos os genes testados. Assim como, a presença de 1,2 propanodiol reduz a capacidade de invasão *in vitro* na ausência de VisP. Os dados apresentados nesse estudo reforçam a importância de VisP durante o processo infeccioso no lúmen intestinal, onde a disponibilidade de nutrientes é restrita e a capacidade de utilizá-los é de grande importância.

Palavras-chave: *S. Typhimurium*; patogenicidade; transcriptoma; VisP; 1,2 propanodiol

Abstract

Salmonella species are the ones that cause the most foodborne diseases in the world, being one of the main bacterial causes of gastroenteritis. *S. Typhimurium* is commonly used to study interactions with host cells, because intestinal bacteria are extremely efficient in orchestrating intraspecific and interspecific communication, through complex chemical signaling systems. Studies show the importance of VisP protein in the bacterial cell periplasm, integrating care with membrane homeostasis, bacterial virulence processes and stress response in *S. Typhimurium*. The intestine has a dense and diverse microbiota, in addition to a wide variety of nutrients. The intestinal microbiota has the ability to make different sugars available through enzymatic activity, as well as other types of metabolites. The exploitation of these by-products derived from microbiota as nutrients and other signs is crucial for the success of infection by enteric pathogens. Therefore, the present study sought to elucidate the role that VisP could play in the virulence of *S. Typhimurium* and its relationship with the expression of other genes, such as those related to metabolic pathways involved in the infection process by this pathogen. For this purpose, a study of the gene expression pattern was carried out to define the influence of sugars on the regulation of the *visP/ygiV* operon and phenotype tests under different conditions. The results obtained indicate that the *visP/ygiV* operon may be regulated by some sugars. The transcriptome of the $\Delta visP$ mutant strain was obtained using the RNAseq technique, which demonstrated the importance of this protein for *S. Typhimurium*, given the large number of differentially expressed transcripts compared to the wild-type. Gene expression and phenotypic assays were performed under different conditions (availability of nutrients and oxygen), in order to relate the VisP absence with the reduction in the expression of genes related to the 1,2 propanediol invasion and metabolism mechanism. The results show that the change in nutrient and oxygen availability alters the expression pattern of both genes tested. Likewise, the presence of 1,2 propanediol reduces the capacity for invasion in vitro in VisP absence. The data presented in this study reinforce the importance of VisP during the infectious process in the intestinal lumen, where the availability of nutrients is restricted and the ability to use them is of great importance.

Key words: *S. Typhimurium*; pathogenicity; transcriptome; VisP; 1,2 propanediol

Lista de Figuras

Figura 1: Modelo de patogênese de <i>S. Typhimurium</i>	14
Figura 2: Modelo da regulação por AI-3/epinefrina/noraepinefrina <i>Salmonella</i> enterica sorovar Typhimurium via QseEF e QseBC.....	17
Figura 3: Organização dos operons de <i>visP/ygiV</i> e <i>qseBC</i>	18
Figura 4: Modelo de VisP de <i>S. Typhimurium</i>	19
Figura 5: Mecanismo da regulação transcricional de AraC.	20
Figura 6: Colonização de <i>S. Typhimurium</i> frente à resistência mediada pela microbiota intestinal.....	22
Figura 7: Modelo para o controle de SPI-1 por propionato e reguladores genéticos.	26
Figura 8: Catabolismo de 1,2 propanodiol e propionato em <i>S. Typhimurium</i>	27
Figura 9: Esquematização da utilização de 1,2-propanodiol por <i>S. Typhimurium</i> durante o processo de infecção.	28
Figura 10: Sequência das regiões regulatórias do operon <i>visP/ygiV</i>	33
Figura 11: Esquema das construções contendo os dois promotores do operon <i>visP/ygiV</i>	34
Figura 12: Avaliação da influência de D-glicose e D-maltose no crescimento e sobrevivência das linhagens SL1344 selvagem (WT) e mutante $\Delta visP$	41
Figura 13: Avaliação da influência de L-arabinose e D-manose no crescimento e sobrevivência das linhagens SL1344 selvagem (WT) e mutante $\Delta visP$	42
Figura 14: Análise do padrão de expressão do operon <i>visP/ygiV</i> através do ensaio de atividade de β -galactosidase, na presença dos açúcares como fonte de carbono em aerobiose.....	44
Figura 15: Avaliação da influência dos açúcares no crescimento e sobrevivência da linhagem SL1444 selvagem (WT) e mutante $\Delta visP$ em baixas concentrações de oxigênio.	46
Figura 16: Análise do padrão de expressão do operon <i>visP/ygiV</i> através do ensaio de atividade de β -galactosidase, na presença dos açúcares como fonte de carbono com restrição de oxigênio.....	48
Figura 17: Transcritos diferencialmente expressos comparando a linhagem mutante $\Delta visP$ com a SL1344 WT.....	50
Figura 18: Volcano plot de 4577 transcritos identificados no RNAseq.	50

Figura 19: Ontologia gênica dos transcritos com expressão reduzida no mutante Δ visP relativo à amostra selvagem.	52
Figura 20: Ontologia gênica dos transcritos com expressão aumentada no mutante Δ visP relativo à amostra selvagem.	52
Figura 21: Heatmap dos níveis de expressão dos genes relacionados pertencentes à SPI-1 e genes da via de degradação de 1,2 PD.	53
Figura 22: Efeito do 1,2 PD como fonte de carbono na sobrevivência das linhagens.	55
Figura 23: Padrão de expressão dos genes pdu em diferentes condições de crescimento.	57
Figura 24: Perfil de expressão gênica de genes relacionados ao mecanismo de invasão nas linhagens cultivadas com LB em aerobiose.	59
Figura 25: Padrão de expressão de genes relacionados ao mecanismo de invasão em diferentes condições de crescimento.	62
Figura 26: Invasão em células epiteliais HeLa em diferentes condições.	64

Lista de Tabelas

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas nos ensaios de caracterização fenotípica e análise de expressão gênica.29

Tabela 2: Sequências dos primers utilizados no presente estudo.36

Sumário

1. Introdução	13
1.1 Gênero <i>Salmonella</i>	13
1.2 Mecanismos de patogenicidade de <i>S. Typhimurium</i>	13
1.3 Sinalização química	15
1.4 Operon <i>visP/ygiV</i>	17
1.5 Interação <i>Salmonella</i> - microbiota intestinal e utilização de nutrientes	20
1.5.1 Fontes de carbono e energia	22
1.5.2 Ácidos graxos de cadeia curta e utilização de 1,2 propanodiol	25
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Material e Métodos	29
3.1 Cultivo das linhagens para os ensaios	29
3.2 Distintos açúcares como fonte de carbono em aerobiose	30
3.3 Distintos açúcares como fonte de carbono em microaerofilia	30
3.4 Composto 1,2 PD como fonte de carbono	31
3.5 Cultivo de célula epitelial Hela	31
3.6 Análise do padrão de expressão da região promotora do operon <i>visP/ygiV</i>	32
3.6.1 Ensaio de atividade de β -Galactosidase	34
3.7 Extração de RNA	34
3.8 Análise de expressão gênica por qRT-PCR	35
3.9 RNAseq do mutante $\Delta visP$	37
3.9.1 Construção de biblioteca e sequenciamento	37
3.9.2 Análise dos dados transcriptômicos	38
3.9.3 Ontologia gênica	38
3.10 Análise Estatística	39
4. Resultados e Discussão	39
4.1 Diferentes açúcares como única fonte de carbono em aerobiose	39
4.2 Diferentes açúcares como única fonte de carbono em baixas concentrações de oxigênio	45
4.3 Transcriptoma do mutante $\Delta visP$ via RNAseq	48
4.4 Relação de <i>visP</i> com a expressão de genes relacionados ao metabolismo de 1,2 PD	53

4.5	Influência de VisP no mecanismo de invasão de <i>S. Typhimurium</i> em diferentes condições	58
	Conclusão	66
	REFERÊNCIAS.....	68

1. Introdução

1.1 Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* composto por bacilos entérico Gram-negativo, patogênico, pertencente à família Enterobacteriaceae, que consiste em duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (FÀBREGA; VILA, 2013; ISSENHUTH-JEANJEAN; ROGENTIN; MIKOLEIT; GUIBOURDENCHE *et al.*, 2014). Dentre as subespécies, a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* é a cepa mais comumente relacionada às doenças em seres humanos, mas também pode infectar uma ampla gama de hospedeiros (FOOKES; SCHROEDER; LANGRIDGE; BLONDEL *et al.*, 2011). E entre estas destaca-se, pelo interesse clínico, as sorovariedades não tifoidais (NTS) *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, que causam as gastroenterites, e as sorovariedades tifoidais *S. Typhi* e *S. paratyphi*, que causam a febre tifoide (FÀBREGA; VILA, 2013; LAROCK; CHAUDHARY; MILLER, 2015).

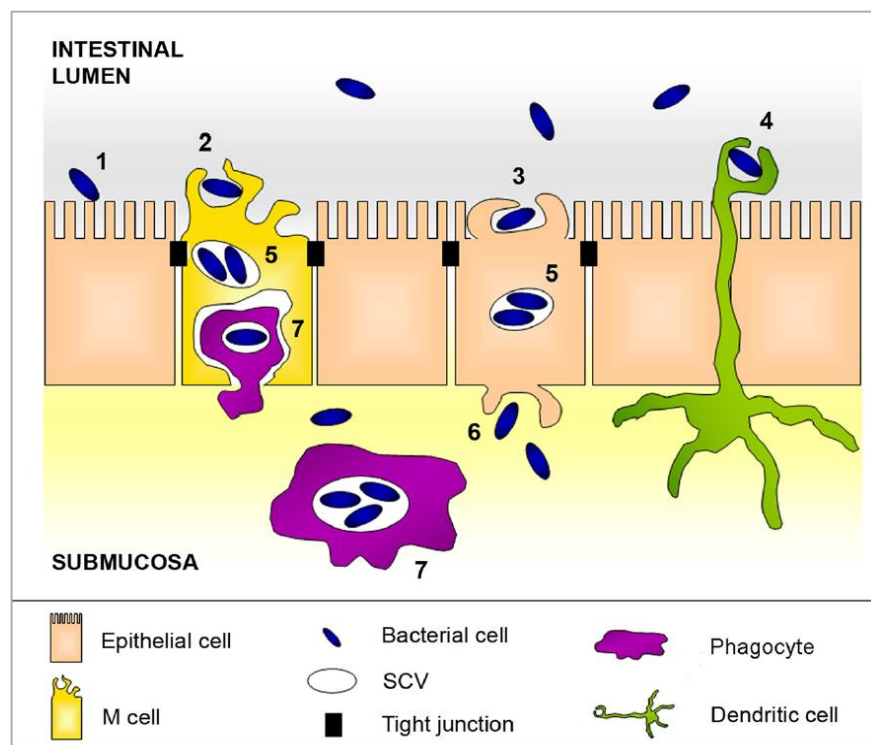
As espécies de *Salmonella* estão entre as que mais causam doenças de origem alimentar no mundo e uma das principais causas bacterianas de gastroenterite, que podem ser casos leves ou moderados e não necessita de tratamento, ou casos severos, que geralmente acometem pacientes imunocomprometidos, crianças e idosos (FÀBREGA; VILA, 2013). São adquiridas pela ingestão de alimentos como também por água contaminados e são capazes de sobreviver à acidez gástrica para obter acesso ao epitélio intestinal (LAROCK; CHAUDHARY; MILLER, 2015).

1.2 Mecanismos de patogenicidade de *S. Typhimurium*

S. Typhimurium pode resistir ao suco gástrico, aos sais biliares e possui habilidade de replicação intracelular, o que concede vantagens de crescimento no lúmen intestinal e evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Por isso, é uma bactéria utilizada como modelo para estudo de interações com células hospedeiras (FÀBREGA; VILA, 2013; LAROCK; CHAUDHARY; MILLER, 2015). Para invadir as barreiras da mucosa intestinal do hospedeiro, essas bactérias podem ser englobadas por fagócitos no lúmen intestinal. Elas geralmente utilizam como porta

de entrada as células M e enterócitos, mas também podem induzir a sua própria absorção pelas células epiteliais, como mostra a figura 1 (FÀBREGA; VILA, 2013; SANTOS; TSOLIS; BÄUMLER; ADAMS, 2003). *S. Typhimurium* tem a capacidade de se replicar dentro de vacúolos em macrófagos, o que também é uma característica da sua patogênese. Esses mecanismos de invasão, assim como colonização, sobrevivência e multiplicação no interior das células do hospedeiro são dependentes de uma variedade de fatores de virulência que são codificados por genes específicos (LAROCK; CHAUDHARY; MILLER, 2015).

Figura 1: Modelo de patogênese de *S. Typhimurium*.



1) As células de *Salmonella* se ligam ao epitélio intestinal por meio de adesinas. **2 e 3)** Então, segue o processo de invasão e fagocitose das bactérias mediados por fatores de virulência codificados na SPI-1 e SPI-5. **4)** Alternativamente, as células bacterianas também podem ser fagocitadas diretamente pelas células dendríticas. **5)** Dentro do citoplasma, *Salmonella* se localiza dentro do SCV, onde se replica. **6)** Os SCVs transitam para a membrana basolateral e liberam as células internas para a submucosa. **7)** As bactérias são internalizadas nos fagócitos e novamente localizadas em um SCV. **Fonte:** FÀBREGA; VILA (2013).

Os genes de virulência podem estar presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, ou fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria. Essas regiões do genoma de *Salmonella* são conhecidas como Ilhas de

Patogenicidade, caracterizadas por grandes regiões do DNA que conferem virulência e podem, por exemplo, codificar proteínas efetoras (FÀBREGA; VILA, 2013; HARAGA; OHLSON; MILLER, 2008).

Diversas Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI - “*Salmonella* Pathogenicity Islands”) são descritas na literatura, e nem todas têm suas funções totalmente elucidadas. As duas principais Ilhas de Patogenicidade ligadas ao processo patogênico de *S. Typhimurium* são SPI-1, relacionada à invasão celular (GALÁN; CURTISS, 1989) e SPI-2, relacionada à sobrevivência intracelular, sobrevivência em macrófagos e infecção sistêmica em camundongos (CIRILLO; VALDIVIA; MONACK; FALKOW, 1998; OCHMAN; SONCINI; SOLOMON; GROISMAN, 1996).

A patogênese de *S. Typhimurium* é altamente dependente de dois Sistemas de Secreção do Tipo 3 (T3SS) codificados nas ilhas SPI-1 e SPI-2, que auxiliam na invasão e sobrevivência na célula do hospedeiro. Os T3SS são estruturas em forma de agulha molecular que injetam as proteínas efetoras essenciais durante esses dois momentos do processo infeccioso, invasão e sobrevivência (GALÁN, 1996; SHEA; HENSEL; GLEESON; HOLDEN, 1996; ZHOU; CHEN; HERNANDEZ; SHEARS *et al.*, 2001).

Algumas proteínas efetoras alteram a via de sinalização da célula hospedeira, com o objetivo de promover uma alteração no citoesqueleto com consequente endocitose da *Salmonella*. Após a invasão inicial, o fagossomo é então formado e se funde aos lisossomos, o que origina o *Salmonella Containing Vacuole* (SCV), onde a bactéria utiliza a maquinaria do hospedeiro, com auxílio dos efetores secretados pelo T3SS de SPI-2, que evita a resposta imune mediada por neutrófilos (FÀBREGA; VILA, 2013; LAROCK; CHAUDHARY; MILLER, 2015).

1.3 Sinalização química

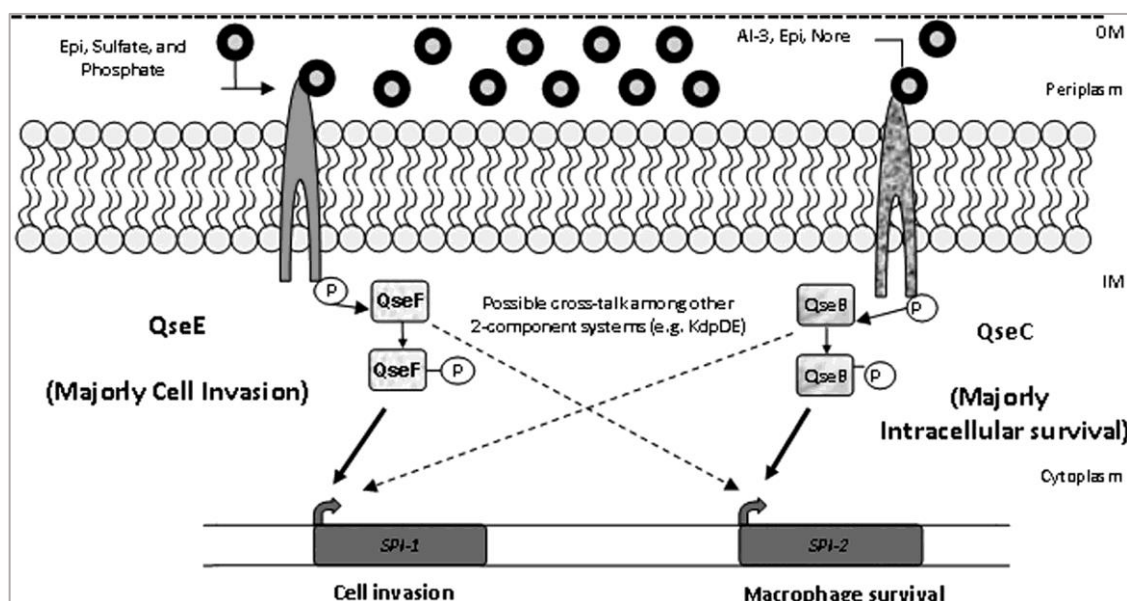
As células do hospedeiro e do patógeno possuem mecanismos de comunicação, tanto intra e interespecífica ou até inter e intra-Reinos (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). Esses mecanismos estão relacionados a sinalizações químicas detectadas por sistemas que atuam como sensores do meio externo e regulam os mecanismos da célula em resposta ao estímulo. Os sensores facilitam o reconhecimento do ambiente da célula do hospedeiro, fazendo com que a

bactéria possa ativar a expressão de certos genes de virulência (RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008).

Um importante mecanismo de sinalização química entre patógeno e hospedeiro é via hormônios adrenérgicos de estresse do hospedeiro, Epinefrina (Epi) e Norepinefrina (Nor), e uma molécula provinda da microbiota, o Autoindutor 3 (AI-3). Esses sinais são reconhecidos por um sistema de 2-componentes, que constitui de um sensor histidina quinase da membrana de bactérias patogênicas e um regulador de resposta, que detecta e promove uma resposta rápida a um estímulo ou estresse vindo do ambiente (CLARKE; HUGHES; ZHU; BOEDEKER *et al.*, 2006; SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003).

O sistema de 2-componentes QseBC foi descrito e reportado na participação da virulência em *S. Typhimurium* (MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010; PATEL; GALÁN, 2006). O sensor histidina quinase QseC fosforila o seu regulador cognato, QseB, o qual irá ativar uma cascata de regulação, resultando na expressão de fatores de virulência. Outro sistema de 2-componentes sob a regulação de Epi, mas abaixo na cascata de regulação, é o QseEF. O sensor quinase QseE reconhece além de Epi, variações nos níveis de íons de sulfato e fosfato do ambiente e fosforila seu regulador de resposta cognato QseF (READING; TORRES; KENDALL; HUGHES *et al.*, 2007) regulando, por exemplo, a SPI-1 de *S. Typhimurium* promovendo sua virulência (MOREIRA; SPERANDIO, 2012). Esses sistemas de sinalização estão esquematizados na figura 2, eles são descritos para diversas espécies de bactérias patogênicas, e possuem muitas funções na virulência das mesmas (CLARKE; HUGHES; ZHU; BOEDEKER *et al.*, 2006; SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003).

Figura 2: Modelo da regulação por AI-3/epinefrina/noraepinefrina *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium via QseEF e QseBC.



QseC detecta AI-3/epinefrina (Epi)/noraepinefrina (NE) para aumentar sua autofosforilação, enquanto QseE detecta PO_4 , SO_4 , Epi e NE. QseE fosforila exclusivamente QseF, enquanto QseC fosforila QseB e QseF. Além de fosforilar o QseB, o QseC também desfosforila esse regulador de resposta. A ação integrada de QseBC e QseEF com vários sistemas de dois componentes, leva à expressão de SPI-1 e *sifA* e ao aumento da patogênese de *S. Typhimurium*. **Fonte:** MOREIRA; SPERANDIO (2012).

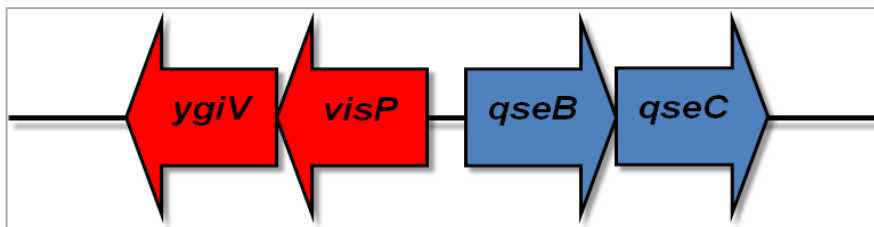
1.4 Operon *visP/ygiV*

A proteína periplasmática denominada VisP (*Virulence and Stress-related Periplasmic Protein*), participa das funções celulares básicas e de manutenção da membrana celular como também na sobrevivência e virulência de *S. Typhimurium* (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). Essa proteína foi identificada durante um estudo de caracterização da importância do sensor quinase QseC na patogênese de *S. Typhimurium in vivo* (MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010).

O gene *visP* faz parte do regulon de QseBC e está localizado em um operon transcrito na direção oposta ao *qseBC*, como mostra a figura 3 (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). A proteína VisP também está conectada à via de sinalização química por Epi/Nor/Autoindutor-3 presentes em EHEC e *S. Typhimurium* via sistema QseBC, e possui participação em funções

celulares básicas como manutenção de membrana, metabolismo e resposta ao estresse (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003).

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

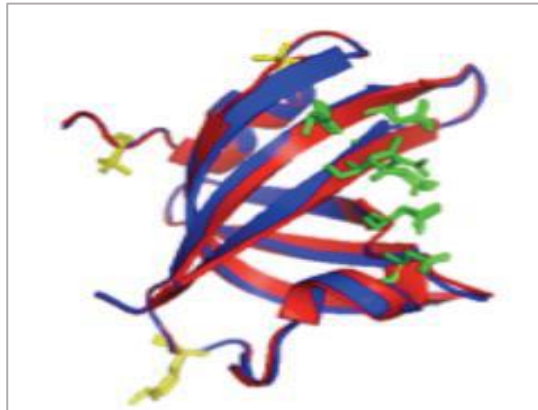


Em *S. Typhimurium*, o gene *visP* apresenta-se *upstream* ao gene *ygiV*, que codifica um regulador de transcrição da família AraC, ambos são transcritos em um mesmo operon e localizados no mesmo regulon de QseBC. **Fonte:** MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.* (2013).

VisP foi classificada *in silico* como uma proteína da família BOF (Oligonucleotide/oligosaccharide Binding Fold). Essas proteínas ligam-se a oligossacarídeos, que são abundantes na camada de peptidoglicano (GINALSKI; KINCH; RYCHLEWSKI; GRISHIN, 2004). VisP se liga à porção de açúcar do peptidoglicano e inibe a dioxigenase (LpxO) resultando em menor modificação do lipopolissacarídeo dependente de LpxO e aumento da resistência a estressores dentro do vacúolo durante a replicação no macrófago (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013).

A estrutura de VisP em *S. Typhimurium* foi previamente determinada (Figura 4) e os seis resíduos de aminoácidos da bolsa de ligação de BOF são compartilhados entre *S. Typhimurium* e *E. coli*, que contem essa proteína conservada (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). Seu sítio de interação com açúcares de baixo peso molecular, característica das proteínas da família BOF, também foi determinado (GINALSKI; KINCH; RYCHLEWSKI; GRISHIN, 2004). Isso demonstrou a importância de VisP no periplasma da célula bacteriana, integrando os cuidados com a homeostase da membrana aos processos de virulência bacteriana e resposta ao estresse (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013).

Figura 4: Modelo de VisP de *S. Typhimurium*.

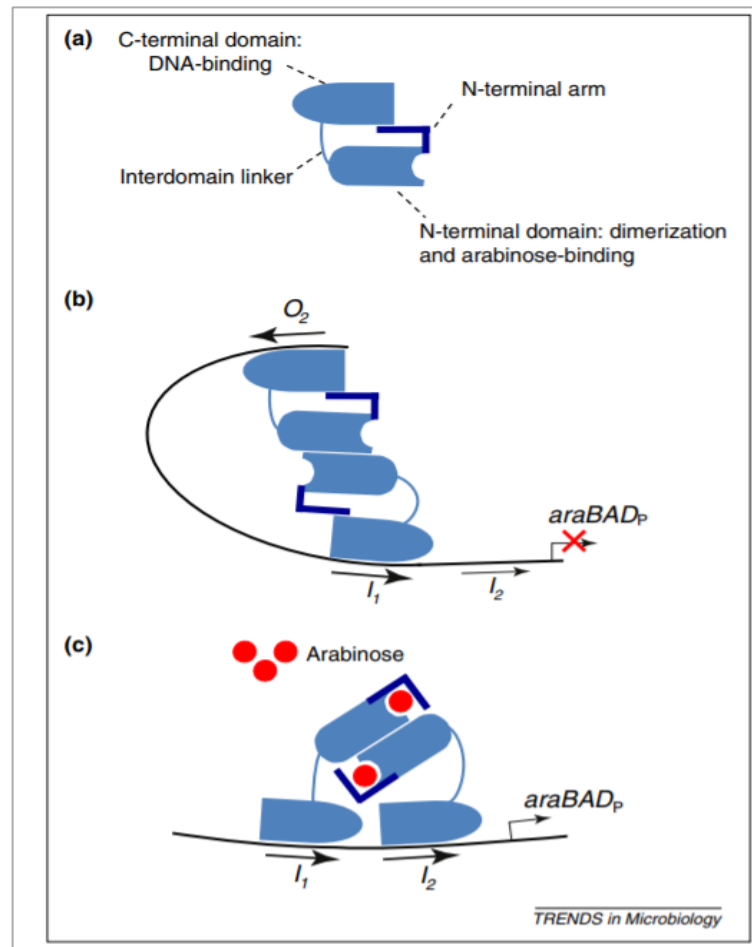


Representação *in silico* de VisP, classificada como uma proteína da família BOF (Oligonucleotide/oligosaccharide Binding Fold). **Fonte:** MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.* (2013).

Em *S. Typhimurium*, o gene *visP* apresenta-se *upstream* ao gene *ygiV*, que codifica um regulador de transcrição da família AraC, e ambos são transcritos em um mesmo operon (Figura 3) (MERIGHI; SEPTER; CARROLL-PORTILLO; BHATIYA *et al.*, 2009). Em *E. coli* K12, YgiV foi descrito atuando como repressor da transcrição do gene *mcbR*, que inibe *ybiM*, que codifica uma proteína periplasmática, envolvida na formação de biofilme (ZHANG; GARCÍA-CONTRERAS; WOOD, 2008).

Os membros da família AraC estão envolvidos na regulação de diversos processos como metabolismo de carbono, resposta a estresses e virulência. Em geral, estes reguladores apresentam dois domínios um de ligação ao DNA (HTH) e o segundo na região N-terminal pode estar envolvido na dimerização do regulador ou pode ser sítio de um ligante. O membro que deu nome à essa família, o regulador AraC, responde a arabinose e atua como ativador e repressor do operon *araBAD* (Figura 5). Na ausência de arabinose dois dímeros de AraC se ligam na região promotora do operon e provoca um loop no DNA impedindo a transcrição do operon, porém na presença de arabinose o dímero de AraC ligado ao DNA sofre uma alteração alostérica, que permite que o dímero AraC ocupe dois sítios proximais adjacentes, e isso leva à abertura da alça do DNA e ativação da transcrição (YANG; TAUSCHEK; ROBINS-BROWNE, 2011).

Figura 5: Mecanismo da regulação transcrricional de AraC.



(a) Representação esquemática do monômero AraC. **(b)** Na ausência de arabinose dois dímeros de AraC se ligam na região promotora do operon e provoca um loop no DNA impedindo a transcrição do operon. **(c)** Na presença de arabinose o dímero de AraC ligado ao DNA sofre uma alteração alostérica, permitindo que o dímero AraC ocupe dois sítios proximais adjacentes, levando à abertura da alça do DNA e ativação da transcrição. **Fonte:** YANG; TAUSCHEK; ROBINS-BROWNE (2011).

1.5 Interação *Salmonella* - microbiota intestinal e utilização de nutrientes

A *Salmonella* é um dos principais patógenos do trato gastrointestinal e sabe-se que nos mamíferos esse é um ambiente complexo em que as associações bactéria-hospedeiro são fundamentais. O intestino possui uma microbiota densa e diversa, muitas vezes relacionada aos estados de saúde do hospedeiro e contém uma ampla variedade de nutrientes de várias fontes diferentes, endógenas e exógenas (ANDERSON; KENDALL, 2017; KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012; SONNENBURG; XU; LEIP; CHEN *et al.*, 2005).

A microbiota do trato gastrointestinal, além de fornecer nutrientes e vitaminas, pode afetar o metabolismo, o sistema digestivo e outros sistemas do hospedeiro

(FERREYRA; NG; SONNENBURG, 2014; SHARON; GARG; DEBELIUS; KNIGHT *et al.*, 2014). As bactérias que fazem parte dessa microbiota são, em grande parte, dos filos Bacteroidetes e Firmicutes, em sua maioria anaeróbios facultativos (KHAN, 2014). Essa microbiota pode conferir uma barreira aos patógenos entéricos, promovendo uma resistência à colonização (BOHNHOFF; DRAKE; MILLER, 1954). Estudos em que foram utilizados camundongos com sua microbiota gastrointestinal depletada (ou pelo uso de antibióticos ou camundongos “germ free”), esses animais se mostraram mais suscetíveis às infecções causadas por enterobactérias patogênicas como *Shigella flexneri*, *Citrobacter rodentium*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (BOHNHOFF; DRAKE; MILLER, 1954; SASSONE-CORSI; RAFFATELLU, 2015).

A composição da microbiota de cada indivíduo difere em diversidade de gênero e espécies, isso pode ser variável dependendo de fatores ambientais, hábitos alimentares, genética do hospedeiro, entre outros. Levando a uma suscetibilidade variável a doenças infecciosas entre os indivíduos, e algumas dessas composições podem levar à expansão ou virulência aumentada de alguns patógenos (BOHNHOFF; DRAKE; MILLER, 1954; CAMERON; SPERANDIO, 2015; SASSONE-CORSI; RAFFATELLU, 2015).

Os diferentes fatores que podem ser produzidos pelas variadas composições de microbiota e os produzidos pelo próprio hospedeiro podem moldar o resultado da interação patógeno-hospedeiro no lúmen intestinal, influenciando a patogênese de algumas enterobactérias, como a *S. Typhimurium*. A figura 6 esquematiza a interação da *Salmonella* com a microbiota no processo de estabelecimento da infecção e os diferentes nutrientes disponíveis no ambiente intestinal durante essa colonização (ANDERSON; KENDALL, 2017). Esse patógeno se adapta a diferentes ambientes durante a colonização e no processo de infecção, isso confere diferentes disponibilidades de nutrientes e moléculas, que podem ser providas da microbiota ou do hospedeiro. Sendo assim, há uma diversidade de interações dinâmicas entre a *Salmonella* e a microbiota intestinal, pois ambos competem por nutrientes essenciais (ANDERSON; KENDALL, 2017; CAMERON; SPERANDIO, 2015).

O trato gastrointestinal é um ambiente rico em diversos nutrientes, entretanto os substratos capazes de permitir o crescimento fermentativo no ambiente anaeróbio são limitados. Os nutrientes presentes no intestino têm efeitos profundos na composição da microbiota, mas também podem atuar como sinais para influenciar a fisiologia dos patógenos. Um dos papéis da microbiota é a manipulação de fontes de carboidratos presentes nesse ambiente. Os membros da comunidade da microbiota são fermentadores com uma ampla capacidade metabólica, sendo capazes de digerir estruturas glicanas complexas originárias da dieta do hospedeiro, e estruturas do próprio hospedeiro como muco e glicanos associados às células, que não são digeridos por micróbios invasores. Essa capacidade metabólica permite à microbiota explorar nichos únicos e sobreviver no intestino humano na homeostase (MARTENS; CHIANG; GORDON, 2008; SONNENBURG; XU; LEIP; CHEN *et al.*, 2005).

O epitélio intestinal possui uma camada de muco para sua proteção, composta proteínas glicosiladas, as mucinas. Os glicanos da mucosa contêm vários resíduos de açúcar diferentes que são importantes fontes de nutrientes para a microbiota e também para os patógenos intestinais. Esses açúcares podem ser fucose, galactose, ácido siálico, N- acetilgalactosamina, N- acetilglucosamina e/ou manose (LARSSON; KARLSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2009). Alguns membros da microbiota possuem a capacidade enzimática de degradar carboidratos complexos, inclusive das grandes estruturas glicanas do muco, aumentando a disponibilidade desses açúcares no intestino. Assim, outras espécies que não possuem essa capacidade podem utilizar esses açúcares liberados durante esse processo como fonte de nutrientes (CAMERON; SPERANDIO, 2015).

Esses açúcares liberados pela microbiota são nutrientes importantes para patógenos entéricos ao estabelecer sua infecção, pois os mesmos não possuem essa capacidade enzimática de degradar essas estruturas glicanas, porém, muitas vezes, podem catabolizar os açúcares liberados, promovendo sua expansão (MARCOBAL; SOUTHWICK; EARLE; SONNENBURG, 2013). Portanto, a atividade enzimática da microbiota intestinal, até certo ponto, pode tornar o hospedeiro particularmente suscetível a diferentes infecções.

A capacidade de catabolizar o ácido siálico, um açúcar encontrado na camada de muco, aumenta os níveis de colonização de *Clostridium difficile* e *S. Typhimurium* em um modelo de camundongo tratado com antibiótico, conferindo

vantagens de crescimento para os patógenos (NG; FERREYRA; HIGGINBOTTOM; LYNCH *et al.*, 2013). Ambos não possuem capacidade enzimática de liberar esse açúcar das estruturas glicanas, portanto dependem da microbiota para que encontrem essa disponibilidade, principalmente *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. theta*), importante membro dessa comunidade, que possui atividade enzimática para liberar esse e outros açúcares no intestino. Ainda, *B. theta* não possui uma via catabólica para o ácido siálico (XU; BJURSELL; HIMROD; DENG *et al.*, 2003) e presumivelmente codifica essa atividade enzimática apenas para acessar os açúcares subjacentes nos glicanos da mucosa, que são uma importante fonte de carbono para esse organismo (MARTENS; CHIANG; GORDON, 2008). Assim como o ácido siálico, *B. theta* libera fucose do muco, aumentando a disponibilidade desse açúcar no lúmen intestinal, essa fucose livre também pode ser usada como fonte de carbono por *S. Typhimurium* (NG; FERREYRA; HIGGINBOTTOM; LYNCH *et al.*, 2013). A *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) utiliza a fucose como uma molécula sinalizadora para detectar o ambiente do lúmen intestinal e modular seu próprio metabolismo e regular a expressão de seus genes de virulência no lúmen intestinal (PACHECO; CURTIS; RITCHIE; MUNERA *et al.*, 2012).

A microbiota, além de modificar a disponibilidade de açúcares através da atividade enzimática, pode influenciar a produção de glicanos da mucosa pelo hospedeiro. Espécies de *Lactobacillus* podem alterar a paisagem de carboidratos da camada mucosa aumentando a expressão de mucinas pelas células epiteliais do intestino (MACK; MICHAIL; WEI; MCDOUGALL *et al.*, 1999).

Uma variedade de subprodutos metabólicos (gases, ácidos graxos de cadeia curta e ácidos orgânicos) pode ser produzido pela microbiota e utilizados por patógenos entéricos como nutrientes. O hidrogênio molecular é um desses subprodutos (abundante da fermentação anaeróbia da microbiota) e utilizado por patógenos como fonte de energia. A Hyb hidrogenase permite que a *S. Typhimurium* utilize esse hidrogênio para aprimorar seu crescimento durante o estágio inicial da invasão, e esse processo é dependente da microbiota (MAIER; VYAS; CORDOVA; LINDSAY *et al.*, 2013).

A utilização desses subprodutos e outras estratégias podem ser importantes para a expansão dos patógenos através da competição com a própria microbiota. *S. Typhimurium* pode utilizar nitrato ou tetracionato como receptores de elétrons na respiração, sendo um processo mais eficiente para geração de energia do que a

fermentação, o que lhe fornece uma vantagem sobre a microbiota residente e permite que o patógeno acesse novas fontes de carbono. Esse patógeno pode utilizar essa respiração para consumir etanolamina ou 1,2 propanodiol como nutriente. A etanolamina não pode ser usada pela maioria dos membros da microbiota residente, portanto esse processo também confere uma vantagem ao patógeno (THIENNIMITR; WINTER; WINTER; XAVIER *et al.*, 2011).

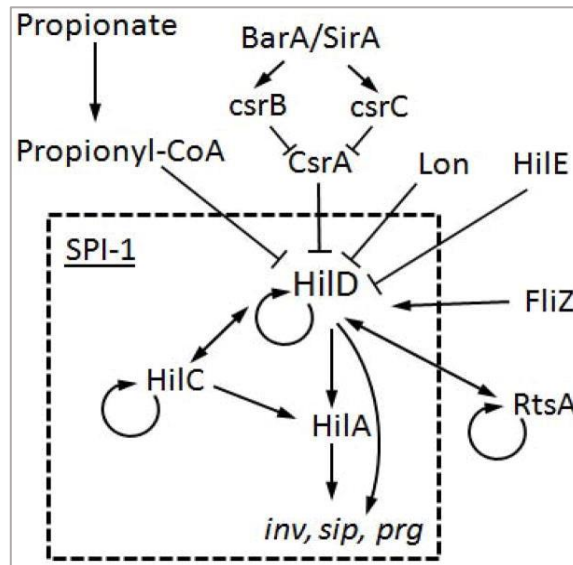
1.5.2 Ácidos graxos de cadeia curta e utilização de 1,2 propanodiol

Os ácidos graxos de cadeia curta, incluindo acetato, propionato e butirato, são subprodutos de fermentação produzidos pela microbiota intestinal importantes para determinação das interações com os patógenos entéricos. A composição e abundância desses ácidos graxos são distintas em diferentes partes do intestino, o que pode contribuir para o reconhecimento de nicho por bactérias patogênicas que possuem capacidade de detectar essas diferentes composições ou, também, utilizar os mesmos como fonte de energia (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016).

Concentrações de acetato, propionato e butirato que mimetizam o íleo e o cólon modulam a expressão de genes de SPI-1 por *S. Typhimurium*, onde as concentrações como encontradas no íleo aumentam a expressão desses genes, relacionados à invasão celular, e as concentrações encontradas no cólon inibem a invasão, diminuindo a expressão desses genes (LAWHON; MAURER; SUYEMOTO; ALTIER, 2002). Individualmente, a exposição ao acetato aumenta a expressão de genes de SPI-1 e o propionato diminui essa expressão através do regulador transcricional HilD (HUNG; GARNER; SLAUCH; DWYER *et al.*, 2013). HilD, um regulador de transcrição da família AraC, compreende uma parte de um circuito de auto-regulação que inclui RtsA e HilC (ELLERMEIER; ELLERMEIER; SLAUCH, 2005), eles induzem a expressão de *hilA*, que codifica um ativador transcricional de diversos operons que codificam T3SS de SPI-1 e proteínas efetoras importantes para o rearranjo citoesquelético. HilC também pode induzir a expressão de SPI-1 independente de HilA (ALTIER; SUYEMOTO; LAWHON, 2000). O efeito repressor de propionato através de HilD é pós traducional e esse processo requer propionil-CoA (Figura 7), produto de alta energia do metabolismo do propionato. O mecanismo de regulação de SPI-1 pelos ácidos graxos de cadeia curta ainda não foi totalmente elucidado, mas sabe-se que esses subprodutos da microbiota intestinal

podem influenciar o modo como as bactérias patogênicas percebem o ambiente e desenvolvem o processo inflamatório.

Figura 7: Modelo para o controle de SPI-1 por propionato e reguladores genéticos.

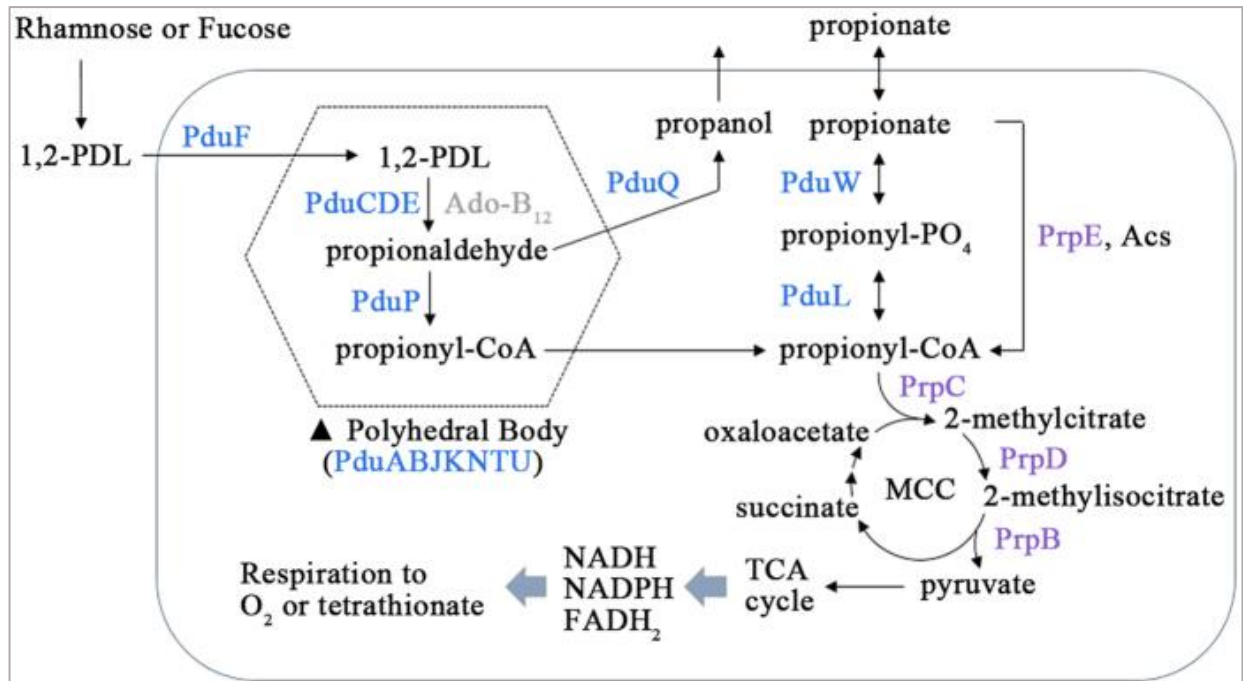


As setas indicam controle positivo, enquanto as barras em forma de T indicam controle negativo.

Fonte: HUNG; GARNER; SLAUCH; DWYER *et al.* (2013).

O propionil-CoA é um metabólito essencial para a repressão da invasão pelo propionato e um intermediário comum das vias de degradação de propionato e 1,2 propanodiol (HUNG; GARNER; SLAUCH; DWYER *et al.*, 2013; PALACIOS; STARAI; ESCALANTE-SEMERENA, 2003). O propionato, além de estar disponível como subproduto da microbiota intestinal, é o produto final da via responsável pelo catabolismo de 1,2 propanodiol mediada pelo operon *pdu* (BOBIK; XU; JETER; OTTO *et al.*, 1997; WALTER; AILION; ROTH, 1997), que pode ser utilizado por *Salmonella* como fonte de carbono (GUTNICK; CALVO; KLOPOTOWSKI; AMES, 1969), e é um abundante produto de fermentação derivado dos açúcares L-ramnose e L-fucose, também disponíveis no intestino (BADÍA; ROS; AGUILAR, 1985; OBRADORS; BADÍA; BALDOMÀ; AGUILAR, 1988). O 1,2 propanodiol é degradado em propionaldeído e posteriormente em 1- propanol e propionato, como mostra a figura 8 (HAVEMANN; SAMPSON; BOBIK, 2002; YOO; KIM; YOON; RYU, 2017).

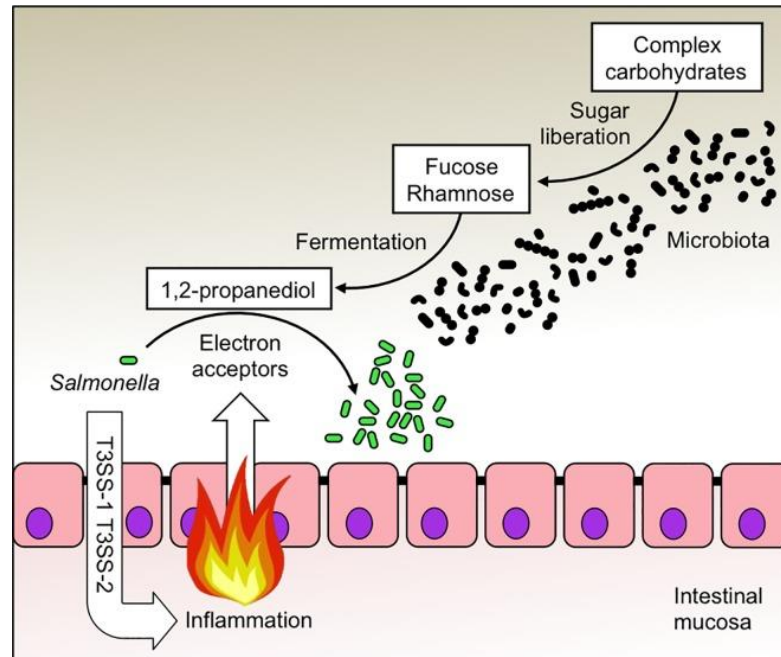
Figura 8: Catabolismo de 1,2 propanodiol e propionato em *S. Typhimurium*.



O catabolismo de 1,2 propanodiol é mediado pelo operon Pdu, indicado em azul. O catabolismo do propionato é realizado pelo operon Prp, indicado em roxo. O propionil-CoA, intermediário comum, fornece piruvato através do ciclo de 2-metilcitrato (MCC), que pode ser usado como fonte de energia. O oxigênio ou tetrationato é usado como um aceptor de elétrons sob condições aeróbias ou anaeróbias, respectivamente. **Fonte:** YOO; KIM; YOON; RYU (2017).

Uma combinação de respiração aeróbia e anaeróbia permite que a *S. Typhimurium* se expanda no intestino inflamado, consumindo 1,2-propanodiol derivado da microbiota, produzido durante a fermentação da fucose ou ramnose (Figura 9). A utilização desse subproduto promove para *S. Typhimurium* uma vantagem na competição nutricional com a microbiota que permite impulsionar sua expansão no lúmen intestinal (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017).

Figura 9: Esquematisação da utilização de 1,2-propanodiol por *S. Typhimurium* durante o processo de infecção.



S. Typhimurium utiliza seus fatores de virulência (T3SS-1 e T3SS-2) para provocar uma inflamação intestinal aguda grave. Um produto secundário da resposta inflamatória do hospedeiro é a geração de aceptores de elétrons exógenos, que criam um nicho de nutrientes respiratórios no lúmen intestinal. Uma combinação de respiração aeróbia e anaeróbia permite que a *S. Typhimurium* se expanda no intestino inflamado, consumindo 1,2-propanodiol derivado da microbiota, produzido durante a fermentação da fucose ou ramnose. Monossacarídeos, como fucose e ramnose, são liberados pela microbiota intestinal a partir de carboidratos complexos. **Fonte:** FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.* (2017).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Elucidar a influência da expressão de VisP na virulência de *S. Typhimurium* e a relação dessa proteína com a expressão de outros genes relacionados a vias metabólicas importantes para estabelecimento da infecção por esse patógeno.

2.2 Objetivos específicos

- Estudo da regulação gênica de VisP em relação à linhagem selvagem via RNAseq.

- Definir a influência de diferentes açúcares na regulação do operon *visP/ygiV* durante a patogênese de *S. Typhimurium* e a diferença na utilização desses açúcares pelas linhagens SL1344 selvagem e mutante $\Delta visP$.
- Elucidar a relação da expressão de *visP* com os genes relacionados à utilização de 1,2 propanodiol.

3. Material e Métodos

3.1 Cultivo das linhagens para os ensaios

As linhagens bacterianas utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de estudos anteriores e estão disponíveis na coleção de bactérias do Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana (PASQUIBAC), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus de Araraquara.

As linhagens estão conservadas em tubos criogênicos em meio Luri Bertani (LB) e glicerol a -80° C. Para utilização nos ensaios foram estriadas em placas contendo meio LB ágar, e cultivadas por um período de 16 horas, a 37° C. As colônias isoladas após o cultivo foram transferidas para tubos contendo 3 mL de meio LB com adição de antibiótico quando necessário, respeitando a marca de resistência de cada linhagem, e cultivadas a 37° C sob agitação por um período de 16 horas. A partir desse pré-inóculo seguiu-se com os protocolos para cada teste fenotípico ou de expressão gênica. A tabela 1 reúne as linhagens cultivadas e utilizadas ao longo deste estudo.

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas nos ensaios de caracterização fenotípica e análise de expressão gênica.

Linhagens	Descrição	Origem
Wild-type (WT) - SL1344	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium protótipo	(HOISETH; STOCKER, 1981)
$\Delta visP$	SL1344 mutante $\Delta visP$	(MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER <i>et al.</i> , 2013)
<i>visP</i> +	SL1344 complementada <i>visP</i>	(MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER <i>et al.</i> , 2013)

Como fonte de carbono foram utilizados os monossacarídeos (açúcares simples): D-glucose, D-manose e L-fucose, classificados como hexoses (monossacarídeos compostos por 6 átomos de carbono); L-arabinose, classificado como uma pentose (monossacarídeo composto por 5 átomos de carbono); e o dissacarídeo D-maltose. Também foi utilizado como fonte de carbono o composto orgânico 1,2 propanodiol (1,2 PD). Para avaliação dessas fontes de carbono foi utilizado um meio mínimo livre de carbono, adaptado de Maloy e Roth (1983) e López-Garrido; Puerta-Fernández; Cota; Casadesús (2015), suplementado com 0,4% dos açúcares correspondentes ou 40 mM de 1,2 PD (concentração de acordo com metodologia descrita anteriormente por (OBRADORS; BADÍA; BALDOMÀ; AGUILAR, 1988)), contendo por litro: KH_2PO_4 3,94 g; K_2HPO_4 6,46 g; Na_2HPO_4 8,46 g; NH_4Cl 1 g e MgSO_4 2 mmol/L.

3.2 Distintos açúcares como fonte de carbono em aerobiose

Para avaliar o crescimento das linhagens WT e ΔvisP utilizando diferentes açúcares como fonte de carbono foram feitas curvas de crescimento e ensaios de viabilidade em aerobiose. Após um inóculo crescido por 16 horas a 37° C, sob agitação, em meio mínimo suplementado com 0,4 % de glicose, foi feita a leitura da D.O. (600nm). Em seguida as culturas foram diluídas para uma D.O. inicial de 0,01 em 15 ml do mesmo meio suplementado com 0,4 % de glicose, maltose, arabinose ou manose. Então, os cultivos foram incubados a 37° C sob agitação e as leituras da D.O. (600 nm) foram feitas nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas, para obter a curva de crescimento, além disso, foram retiradas alíquotas das culturas para o plaqueamento em meio LB nos tempos de 0 (início), 8 (fase exponencial) e 24 (fase estacionária) horas, para determinação das UFC (unidades formadoras de colônia) e avaliação da viabilidade celular no período de crescimento nessas condições.

3.3 Distintos açúcares como fonte de carbono em microaerofilia

Para avaliar diferenças fenotípicas no crescimento e na viabilidade das linhagens WT e ΔvisP na presença dos açúcares disponíveis como fonte de carbono em baixas concentrações de oxigênio, foram realizadas curvas de crescimento em ambiente de microaerofilia utilizando jarra de anaerobiose. Após um inóculo por 16

horas, 37° C, sob agitação em meio mínimo suplementado com 0,4 % de glicose, foi feito a leitura da D.O. (600 nm), então as culturas foram diluídas para D.O. 0,05 em 10 ml do mesmo meio mínimo suplementado com 0,4 % de glicose ou suplementados com 0,4 % de arabinose ou fucose, respectivamente. Então, os cultivos foram incubados em jarra de anaerobiose a 37° C e foram realizadas leituras da D.O. (600 nm) nos intervalos de tempo de 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas para determinar as curvas de crescimento, assim como o plaqueamento em meio LB nos tempos de 0 (início), fase exponencial e fase estacionária (tempo determinado de acordo com as curvas de crescimento), para determinação das UFC.

3.4 Composto 1,2 PD como fonte de carbono

Para avaliar a viabilidade das linhagens WT, $\Delta visP$ e $\Delta visP^+$ na presença de 1,2 PD, as bactérias foram previamente cultivadas em LB até atingir D.O. (600 nm) de 1,0. Após esse crescimento prévio, as linhagens foram centrifugadas, ressuspensas em MM suplementado com 40 mM de 1,2 PD e incubadas em condições microaerófilas para posterior plaqueamento determinação das UFC em meio LB nos tempos de 0, 2, 6 e 24 horas.

3.5 Cultivo de célula epitelial HeLa

Para avaliar a virulência das linhagens *in vitro* na presença dos açúcares ou do 1,2 PD, realizamos a quantificação de invasão em células epiteliais HeLa (Laboratório de Biologia Celular – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP), conforme descrito previamente (FIERER; ECKMANN; FANG; PFEIFER *et al.*, 1993; FINLAY; RUSCHKOWSKI; DEDHAR, 1991; PFEIFER; MARCUS; STEELE-MORTIMER; KNODLER *et al.*, 1999). A linhagem foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Thermo Fisher®), acrescido de 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose, 1 mM piruvato sódico, 10 % de soro fetal bovino e Penicilina-Estreptomicina (5000 U/mL, diluída 100 x), em estufa com atmosfera de 5 % CO₂, a 37° C.

As células foram infectadas com as linhagens WT e $\Delta visP$, a partir de um inóculo *overnight* em LB normalizados para a mesma D.O. (600nm). Utilizou-se para a infecção um MOI (*multiplicity of infection*) de 100:1 durante 90 min a 37° C em 5 %

CO₂ e durante o ensaio foi utilizado meio DMEM (sem adição de glicose, piruvato ou glutamina) enriquecido com 10 % de soro fetal bovino e suplementado com glicose, maltose, manose ou fucose, na concentração de 4500 mg/L, ou então 40 mM de 1,2 PD. As células bacterianas após interação com células HeLa foram tratadas com 30 µg/ml de gentamicina por 1 h para matar as bactérias extracelulares remanescentes. Assim, após uma incubação extra de 3 h a 37° C em 5 % CO₂ as células lisadas com solução de Triton-X 1 %. As bactérias foram então diluídas serialmente e plaqueadas em LB com estreptomicina, para determinação das UFC (FIERER; ECKMANN; FANG; PFEIFER *et al.*, 1993; FINLAY; RUSCHKOWSKI; DEDHAR, 1991; PFEIFER; MARCUS; STEELE-MORTIMER; KNODLER *et al.*, 1999).

3.6 Análise do padrão de expressão da região promotora do operon *visP/ygiV*

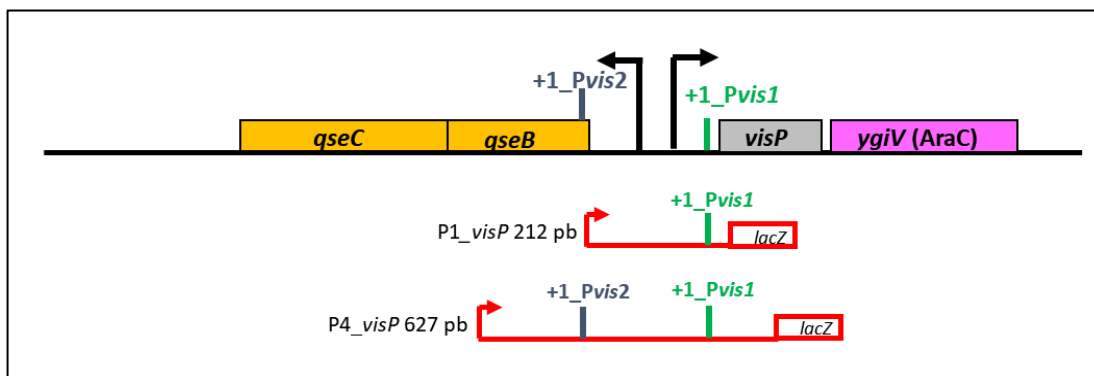
No presente estudo para avaliar a influência dos açúcares na regulação do operon *visP/ygiV* foram realizados ensaios de expressão gênica através do ensaio de atividade de β-galactosidase.

Estudos anteriores determinaram o início de transcrição para o operon *visP/ygiV*. O artigo de Merighi *et al.* (2009) determinou o início de transcrição do operon por “*Primer extension*” usando uma sonda não radioativa, enquanto que o trabalho de Kroger *et al.* (2013) utilizou uma abordagem global para identificação de promotores através de análises do transcriptoma baseado em RNA-seq.

Baseado nesses trabalhos foram definidos alguns elementos regulatórios de transcrição que compõem a região promotora do operon *visP/ygiV* (dados não publicados, projeto de Pós-doutorado PNPD da Dra. Vânia Santos Braz). Estes elementos foram definidos a partir dos inícios de transcrição determinados nos trabalhos acima. A figura 10 mostra o mapeamento de dois promotores para o operon *visP/ygiV* que chamamos de Pvis1 e Pvis2 com seus elementos de transcrição -10 e -35.

Ainda durante o desenvolvimento do projeto de pós-doutorado PNPd, a Dra. Vânia clonou estas regiões no plasmídeo pRK/lacZ290 (MARQUES; GOMES; GOBER, 1997) contendo o gene repórter *lacZ* sem promotor. Os clones positivos no plasmídeo pRK/lacZ290 foram transformados por eletroporação em *E. coli* 7 S17-1 conjugativa. Assim, as construções usadas nesse trabalho cedidas pela Dra. Vânia estão esquematizadas na figura 11. Então, por conjugação as construções fusionadas ao *lacZ* foram introduzidas na linhagem selvagem SL1344 (WT) para realizar o ensaio de atividade de β -galactosidase, no qual é possível medir a atividade do promotor segundo o método de Miller (1972).

Figura 11: Esquema das construções contendo os dois promotores do operon *visP/ygiV*.



As construções foram fusionadas ao gene repórter *lacZ* para determinar os níveis de transcrição através do ensaio de atividade de β -Galactosidase. **Fonte:** Projeto Pós-doutorado PNPD, Dra. Vânia Santos Braz (2019).

3.6.1 Ensaio de atividade de β -Galactosidase

O padrão de expressão destas construções, segundo o método de Miller (1972), foi analisado durante as fases de crescimento exponencial e estacionária. A partir de um inóculo crescido por 16 horas a 37° C, sob agitação, em meio mínimo suplementado com 0,4 % de glicose, foi feita a leitura da D.O. (600nm). Então, a cultura foi diluída para D.O. 0,01 em meio mínimo suplementado com 0,4 % de açúcar (glicose, maltose, arabinose ou manose), utilizado como única fonte de carbono, e incubadas a 37° C sob agitação até atingirem D.O. 0,6 que corresponde a fase exponencial. Para a fase estacionária após a diluição as culturas foram mantidas a 37° C por 24 horas, para então realizar o ensaio de atividade de β -galactosidase (MILLER, 1972).

O mesmo ensaio foi realizado em baixas concentrações de oxigênio, com 0,4 % de açúcar (glicose, fucose ou arabinose) como única fonte de carbono. A partir de um inóculo crescido por 16 horas a 37° C, sob agitação, em meio mínimo suplementado com 0,4 % de glicose, foi feita a leitura da D.O. (600nm), então as culturas foram diluídas para D.O. 0,05, e incubadas em jarra de anaerobiose a 37° C até atingirem D.O. que corresponde a fase exponencial, baseado em curvas de crescimento nas mesmas condições, e para a fase estacionária as células foram mantidas em jarra de anaerobiose a 37° C por 24 horas.

3.7 Extração de RNA

Para utilização nos ensaios de expressão gênica via qRT-PCR e RNAseq foram realizadas extrações de RNA das linhagens utilizadas no estudo. A partir de um inóculo *overnight* em LB (37° C, sob agitação) das linhagens, 500 µL foram inoculados em 25 ml de LB e incubadas a 37° C sob agitação até atingir uma D.O. 1,0, correspondente a fase exponencial tardia, para os ensaios na condição em LB. Já para os ensaios de qRT-PCR na condição de microaerofilia com meio mínimo suplementado com 0,4% de glicose ou fucose, após um inóculo por 16 horas, 37° C, sob agitação em meio mínimo suplementado com 0,4 % de glicose, foi feita a leitura da D.O. (600 nm), então as culturas foram diluídas para D.O. 0,05 em 50 ml do mesmo meio mínimo suplementado com 0,4 % de glicose ou 100 ml do meio suplementado com 0,4 % de fucose, os cultivos foram incubados em jarra de anaerobiose a 37° C até atingir uma D.O. (600 nm) correspondente a fase exponencial tardia para cada condição. Para a condição na presença de 1,2 PD, as linhagens foram previamente cultivadas em LB até atingirem D.O. (600 nm) de 1,0, posteriormente, as cepas foram centrifugadas, ressuspensas em MM suplementado com 40 mM de 1,2 PD e incubadas em jarra de anaerobiose, por 6 horas. Todos os inóculos foram centrifugados (2500 x g, 10 min), os sobrenadantes descartados e os pellets ressuspensos em 500 µL de TRIzol® (Ambion), para o método de extração de RNA.

A técnica utilizada para a extração de RNA consiste no uso de TRIzol, que ao ser adicionado rompe as células, inativa a enzima RNase e dissolve os componentes celulares, enquanto mantém o RNA intacto. Então, as amostras foram aquecidas a 65 °C por 10 minutos, em seguida foi adicionado 100 µL de clorofórmio e homogeneizado. A fase superior aquosa é coletada para um novo tubo e acrescida de 0,5 volume de etanol 100 %, o qual irá solubilizar as moléculas de RNA. A partir desta etapa foi utilizado o kit RNA RiboPure® Bacteria (Thermo Fisher Scientific). Esta solução é posta em uma coluna de separação, que se liga às moléculas de RNA. Por fim, o RNA é eluído da coluna, e tratado com DNase para uma maior purificação.

3.8 Análise de expressão gênica por qRT-PCR

Para avaliar a influência de VisP na expressão de genes envolvidos em mecanismos de patogenicidade de *S. Typhimurium* foi empregada a técnica de qRT-PCR, conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicadas biológicas, e duplicatas experimentais, a partir das extrações de RNA descritas no item 3.6. Cada reação (20 µL) continha o Master Mix SYBR, a transcriptase reversa Multi-scribe (Thermo Fisher Scientific) e inibidor de RNase (Thermo Fisher Scientific) adicionados, além de 100 ng de RNA de amostra. Tal enzima possui atividade de transcriptase reversa e DNA polimerase, possibilitando a PCR quantitativa em um único passo (one-step qPCR). As reações foram normalizadas com o emprego do gene *rpoA* (RNA polymerase subunit A) como gene de referência. Foi utilizado o equipamento QuantStudio3 como termociclador e leitor de fluorescência (Thermo Fisher Scientific). Os primers utilizados nesse estudo estão descritos na tabela 2. Os resultados obtidos pelo ensaio de qRT-PCR foram analisados pelo método de Comparative critical threshold ($\Delta\Delta CT$), conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006).

Tabela 2: Sequências dos primers utilizados no presente estudo.

Primer	Sequência dos primers 5' - 3'	Origem
<i>rpoA</i>	Forward - GCGCTCATCTTCTTCCGAAT Reverse - CGCGGTCGTGGTTATGTG	(MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010)
<i>sipA</i>	Forward - TTTAGTAGCCGCCTGCGATAA Reverse - GCCGTGGTACCGTCTACCA	(MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010)
<i>sopB</i>	Forward - CGGGTACCGCGTCAATTTC Reverse - TGGCGGCGAACCCTATAAA	(MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010)
<i>invF</i>	Forward - CAGGACTCAGCAAAACCCATTT Reverse - TTATCGATGGCGCAGGATTAG	(MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010)
<i>pduA</i>	Forward - GCTTAACCGCAGCCATAGAG Reverse - CCCGGAGCCAATCTTTTCAT	Presente estudo
<i>pduF</i>	Forward - GGCCGCAGCGCTAAATGT Reverse - TGCCATGATCATGCCCATC	Presente estudo
<i>pduW</i>	Forward - CTCGCTCTCACTCTGTTTGC Reverse - ATCCAGTCCTCCCATTGCA	Presente estudo

3.9 RNAseq do mutante *ΔvisP*

Foi realizada uma análise via RNAseq do transcriptoma do mutante de *S. Typhimurium ΔvisP* e comparados os níveis de expressão gênica total entre a amostra selvagem e o mutante. O transcriptoma da linhagem WT foi adquirido anteriormente a esse trabalho pelo Dr. Patrick da Silva, como parte do seu projeto de doutorado.

3.9.1 Construção de biblioteca e sequenciamento

O RNA total extraído das amostras na condição em LB (Item 3.6), em triplicata, foi purificado através do kit Ribo-Zero Bacteria® (Illumina), seguindo as instruções do fabricante, para uma remoção total de RNA ribossomal com maior eficiência através de sondas de afinidade por rRNA bacteriano ligadas a beads magnéticas. O RNA purificado foi quantificado no *Nanodrop 2000*® da Thermo Scientific e a qualidade do mesmo analisada pelo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), o qual realiza uma eletroforese capilar de alta resolução, quantificando e avaliando a integridade do RNA extraído e purificado. Os RNAs foram convertidos em bibliotecas de cDNA através do kit TruSeq® Stranded mRNA (Illumina), também seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, o mRNA purificado é quimicamente fragmentado em tamanhos específicos (~250 pb) e convertido em fita simples de cDNA (DNA complementar) através de primers hexaméricos aleatórios, precedido da síntese da segunda fita de cDNA. Em seguida, os fragmentos de cDNA passam por adenilação na extremidade 3' para complementação com os adaptadores, os quais possuem uma timina sobressaliente na extremidade 3'. Após ligação com os adaptadores, a dupla fita é desnaturada e cada fita é amplificada, resultando em duas construções diferentes devido à posição do índice de sequenciamento. Isso ocorre para que ambas as extremidades de cada fragmento sejam sequenciadas, denominado paired-end. Após o preparo da biblioteca, esta foi quantificada por qPCR, através do método de curva padrão para a realização do sequenciamento com o kit MiSeq® v3 (Illumina), específico para o sequenciador MiSeq® (Illumina).

3.9.2 Análise dos dados transcriptômicos

O processamento dos dados e análises estatísticas foram realizados pelo doutorando Patrick da Silva. Os arquivos gerados pelo sequenciador MiSeq, em formato fastq, apresentam milhares a milhões de *reads* (partes de sequências) de tamanho específico de acordo com o número de ciclos de reações (75 pb no protocolo utilizado nesse estudo). Primeiro é feita a avaliação da qualidade de cada base sequenciada e a trimmagem (filtragem) das *reads* com baixa qualidade, utilizando o software Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) eliminando *reads* menores que 35 pb. Em seguida, o alinhamento e montagem do transcriptoma foi realizado em relação ao genoma de referência de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium SL1344 (KRÖGER; DILLON; CAMERON; PAPENFORT *et al.*, 2012), número de acesso do GenBank GCA_000210855.2, através do software Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). Este software foi alimentado com os arquivos fastq pós-trimmagem e o arquivo fasta da sequência do genoma referência. O software HTSeq fez o cálculo de número de *reads* por transcrito através do transcriptoma montado (ANDERS; PYL; HUBER, 2015) das duas amostras (linhagem *S. Typhimurium* selvagem e mutante $\Delta visP$) em triplicata. Os valores obtidos de cada gene foram comparados (selvagem x mutante) através de análise estatística utilizando-se o pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), em linguagem de programação R, identificando-se aqueles diferencialmente expressos.

3.9.3 Ontologia gênica

Os transcritos diferencialmente expressos foram direcionados para análise de ontologia gênica, através da plataforma online PANTHER (MI; MURUGANUJAN; HUANG; EBERT *et al.*, 2019), que tem como objetivo categorizar os genes em grupo.

3.10 Análise Estatística

Os dados obtidos dos ensaios realizados foram analisados e sua significância estatística foi estabelecida pela análise de variância ANOVA, utilizando-se o teste mais adequado para cada tipo de dados.

4. Resultados e Discussão

Sabe-se que a microbiota intestinal é um ecossistema com importante contribuição para o funcionamento intestinal do hospedeiro, através de um processo de simbiose, no qual nenhum dos dois é prejudicado. Por outro lado, patógenos intestinais, como as distintas sorovariedades de *Salmonella enterica* são capazes de estabelecer infecções intestinais levando ao desequilíbrio da saúde intestinal. Portanto, é necessário entender os processos biológicos de infecção e virulência destes patógenos que podem ser regulados em vários níveis como fatores de transcrição, sistemas de 2-componentes, entre outros. Divergente ao operon *qseBC*, que codifica para o sistema de 2-componentes envolvido na virulência, é transcrito o operon *visP/ygiV* (MERIGHI; SEPTER; CARROLL-PORTILLO; BHATIYA *et al.*, 2009), que participa do regulon de QseBC em *S. Typhimurium*, e também envolvido na virulência desse patógeno (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). Assim, determinar o exato papel de VisP na utilização de diferentes fontes de carbono se torna essencial para melhor compreensão da relação com a virulência deste patógeno e os processos biológicos dependentes da disponibilidade de nutrientes intestinais e como ratificar estes podem influenciar a virulência durante a patogênese.

4.1 Diferentes açúcares como única fonte de carbono em aerobiose

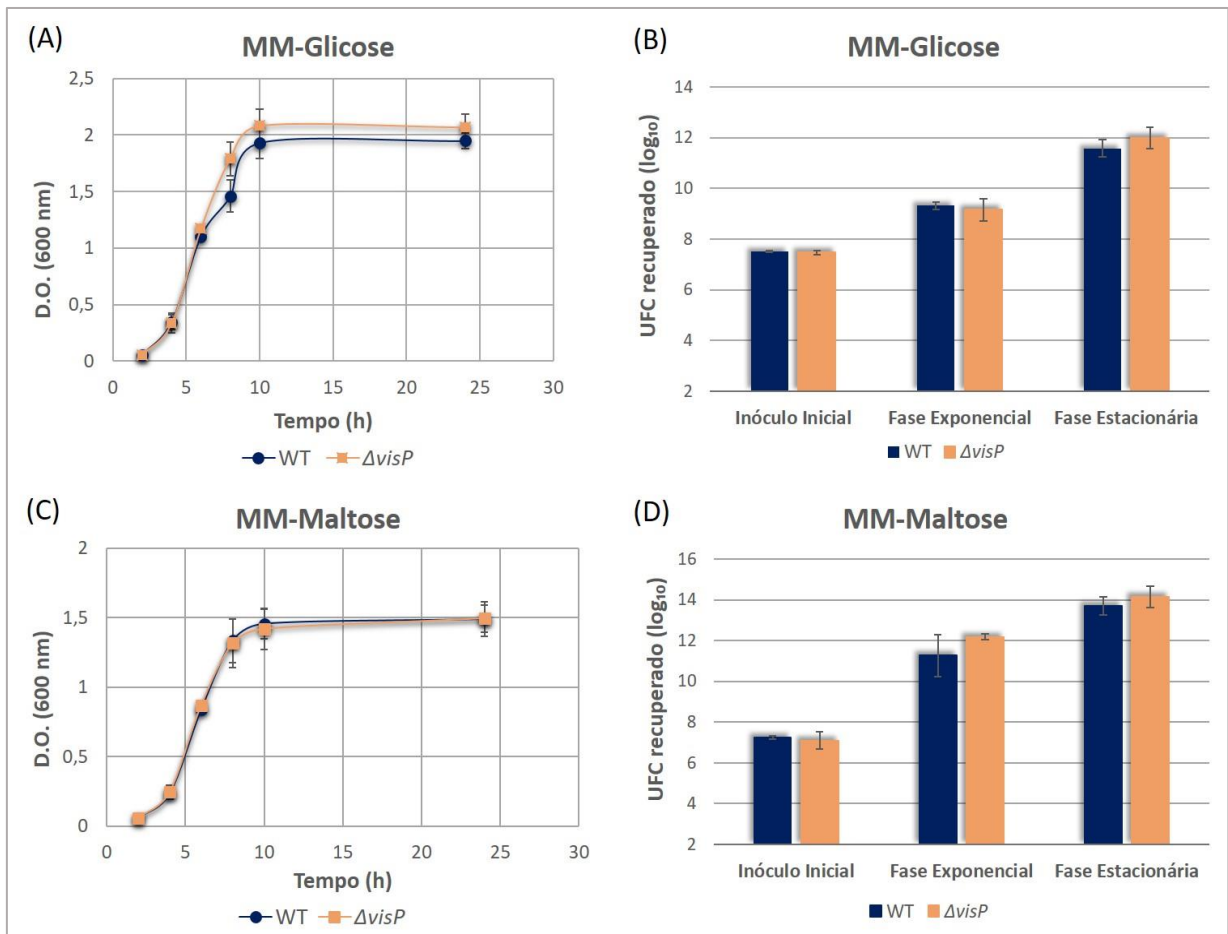
Dados do transcriptoma realizado com linhagem mutante de $\Delta ygiV$ mostraram mudanças na expressão de genes ligados ao metabolismo de diversos açúcares (DA SILVA, 2020). O gene *ygiV* está localizado no mesmo operon de *visP* em *S. Typhimurium* (MERIGHI; SEPTER; CARROLL-PORTILLO; BHATIYA *et al.*,

2009). Até o momento, não há evidências que exista algum promotor na pequena região intergênica localizada na frente do gene *ygiV*, e apesar de *ygiV* codificar um regulador de transcrição da família AraC, ainda não é conhecido em quais processos esse regulador pode atuar.

Para estabelecer a infecção, os patógenos entéricos percorrem diferentes ambientes com diferentes condições e disponibilidade de nutrientes. Por isso, além dos fatores de virulência, a capacidade metabólica de utilização desses diversos nutrientes presentes no hospedeiro, seja eles provindos da dieta ou metabólitos de sua microbiota, são essenciais para o estabelecimento de um nicho ideal para a progressão da infecção. Os carboidratos derivados da dieta do hospedeiro demonstraram desempenhar papéis importantes na dinâmica intestinal microbiota-patógeno (FABICH; JONES; CHOWDHURY; CERNOSEK *et al.*, 2008; MALTBY; LEATHAM-JENSEN; GIBSON; COHEN *et al.*, 2013). Assim como os carboidratos derivados de atividades enzimáticas da microbiota intestinal, que podem manipular essas fontes de carboidratos, digerindo carboidratos complexos e liberando como açúcares simples (LARSSON; KARLSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2009; MARCOBAL; SOUTHWICK; EARLE; SONNENBURG, 2013; MARTENS; CHIANG; GORDON, 2008), disponibilizando como fonte de carbono para patógenos como a *S. Typhimurium*.

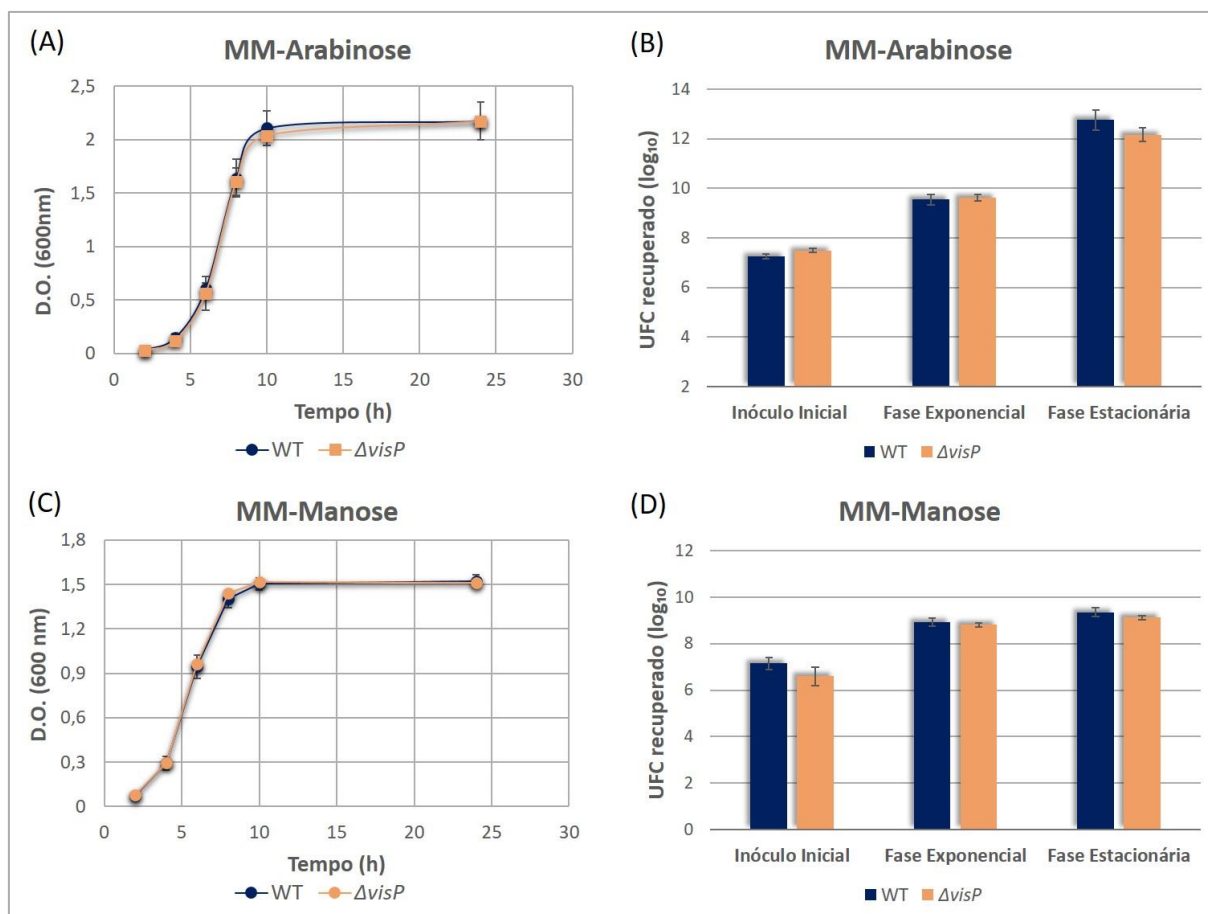
Todos os açúcares testados nesse estudo podem ser utilizados pela *S. Typhimurium* como única fonte de carbono (GUTNICK; CALVO; KLOPOTOWSKI; AMES, 1969). Então, em um primeiro momento, foi avaliado se os diferentes açúcares utilizados como única fonte de carbono teriam influencia no crescimento da linhagem mutante $\Delta visP$ em relação à selvagem WT, como mostram as figuras 12 e 13. Nenhum dos açúcares testados em aerobiose alterou expressivamente a taxa de crescimento (D.O. 600nm) ou a viabilidade celular (UFC/ml) ao longo do período de crescimento das linhagens como pode ser observado nas Figuras 12 e 13. Portanto, as diferentes fontes de carbono testadas não alteram o fenótipo de crescimento da linhagem $\Delta visP$ em relação à WT em condições aeróbias.

Figura 12: Avaliação da influência de D-glicose e D-maltose no crescimento e sobrevivência das linhagens SL1344 selvagem (WT) e mutante $\Delta visP$.



Os açúcares foram utilizados em meio mínimo suplementados com 0,4 % do açúcar, como única fonte de carbono, para obter as curvas de crescimento (D.O. 600nm) e os gráficos determinando a sobrevivência em UFC/ml. **(A)** Curva de crescimento com D-glicose. **(B)** Sobrevivência com D-glicose. **(C)** Curva de crescimento com D-maltose. **(D)** Sobrevivência com D-maltose. Não houveram diferenças estatísticas significativas em comparação com a linhagem selvagem (WT) nessas condições.

Figura 13: Avaliação da influência de L-arabinose e D-manose no crescimento e sobrevivência das linhagens SL1344 selvagem (WT) e mutante $\Delta visP$.



Os açúcares foram utilizados em meio mínimo suplementados com 0,4 % do açúcar, como única fonte de carbono, para obter as curvas de crescimento (D.O. 600nm) e os gráficos determinando a sobrevivência em UFC/ml. **(A)** Curva de crescimento com L-arabinose. **(B)** Sobrevivência com L-arabinose. **(C)** Curva de crescimento com D-manose. **(D)** Sobrevivência com D-manose. Não houveram diferenças estatísticas significativas em comparação com a linhagem selvagem (WT) nessas condições.

Em seguida, foi investigado o padrão de expressão do operon *visP/ygiV* diante destas diferentes fontes de carbono usando as construções P1 e P4 (Figura 11), em frente do gene repórter *lacZ* na linhagem WT, através do ensaio de atividade de β -galactosidase. Vale ressaltar que a diferença das construções P1 e P4 estão destacadas na Figura 11, em que P1 apresenta apenas um promotor mais próximo ao início de tradução do operon, enquanto que a construção P4 apresenta os dois promotores o mais próximo e o mais distal do início de tradução do operon.

É importante lembrar que o gene *ygiV* codifica um regulador de transcrição da família AraC, e membros dessa família estão envolvidos na regulação de diversos processos como metabolismo de carbono, resposta a estresses e virulência (YANG;

TAUSCHEK; ROBINS-BROWNE, 2011). Até o momento não se sabe quais genes *ygiV* regula diretamente, nem em quais condições isso ocorre, contudo está sendo investigado pelo grupo de pesquisa.

Em geral, na fase exponencial pode ser observado um aumento da transcrição de ambos os promotores no meio mínimo suplementado com diferentes açúcares com fontes de carborno quando comparado ao padrão de expressão obtido durante o crescimento em meio rico LB (Figura 14A). Porém, podemos apontar algumas diferenças entre as construções P1 e P4 em relação as fontes de carborno, onde destaca-se a construção P1 nas condições com glicose (com aumento de aproximadamente 3,6 vezes em relação ao LB) e maltose (aumento de aproximadamente 3,3 vezes em relação ao LB), enquanto que a construção P4 mostrou aumento da expressão na presença de arabinose e manose (com aumento em torno de 2,4 e 2 vezes em relação ao LB, respectivamente). No entanto, durante a fase estacionária não observamos aumento igualmente significativo no padrão de expressão, exceto na presença de manose que houve um aumento de 1,5 vezes na construção P1 (Figura 14B).

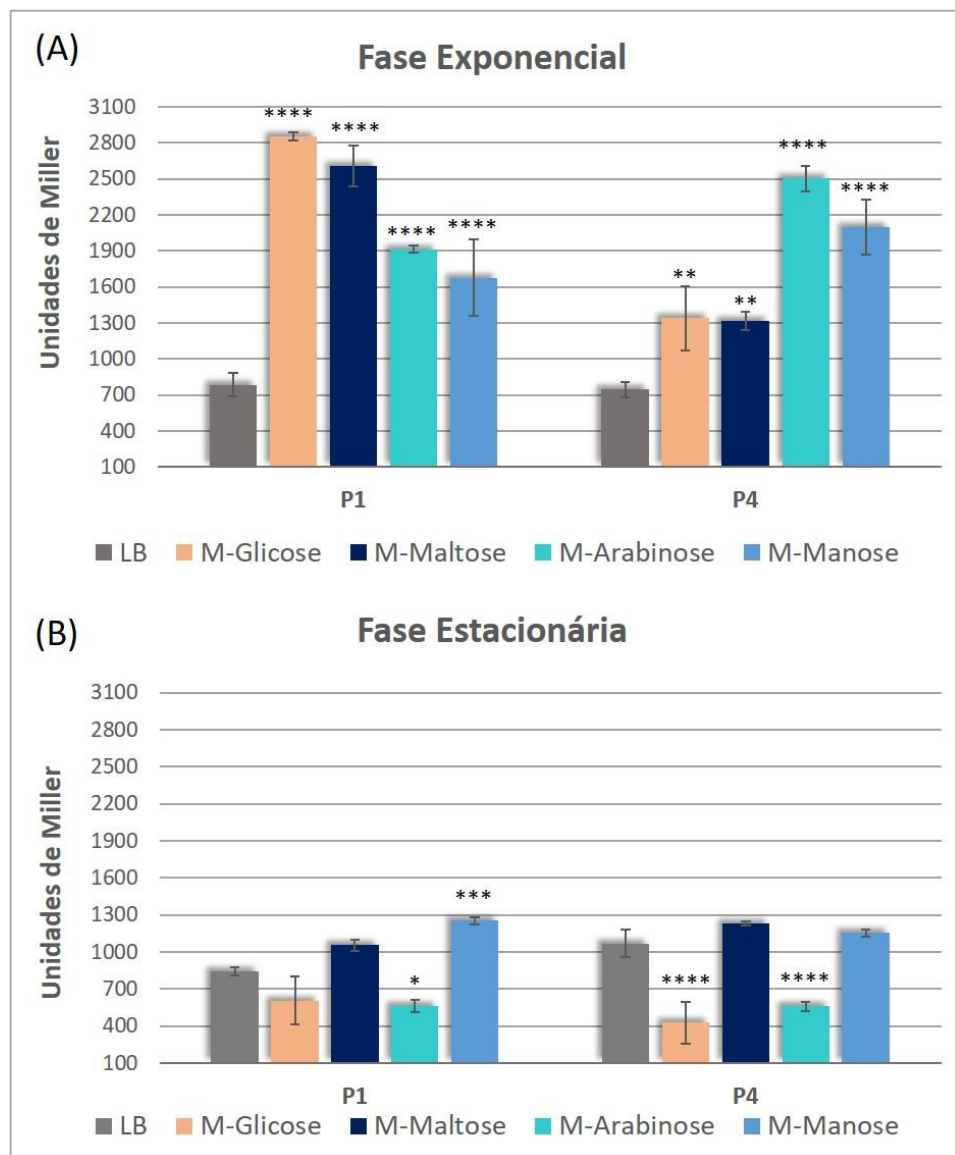
Estes resultados sugerem que o promotor Pvis1 (construção P1) teria maior responsabilidade sobre a transcrição na presença de glicose e maltose, por outro lado, o promotor Pvis2 (construção P4) apresentou maior expressão com arabinose e manose quando comparado à construção P1, em fase exponencial (Figura 14A).

Sendo assim, pode-se inferir que na fase exponencial nessas condições o operon *visP/ygiV* está sendo mais requisitado pela célula. A indução aumentada da construção P4 em relação à P1, na fase exponencial, que indica a atividade do promotor Pvis2, pode sugerir também que o regulador ligado ao promotor Pvis2 impede a expressão do promotor Pvis1.

No ambiente do trato gastrointestinal, há uma grande variedade de moléculas e metabólitos (MARCOBAL; SOUTHWICK; EARLE; SONNENBURG, 2013), para garantir a competição bem-sucedida com os membros da microbiota o patógeno pode ajustar seu metabolismo e ativar seus mecanismos de virulência de acordo com a disponibilidade dessas moléculas ou metabólitos (CLARKE; HUGHES; ZHU; BOEDEKER *et al.*, 2006). A proteína VisP está relacionada aos processos de virulência bacteriana e resposta ao estresse e é de suma importância no periplasma da célula bacteriana (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013), o que pode relacionar essa proteína com outros mecanismos importantes na célula,

como a mudança metabólica dependendo de diferentes fontes de carbono disponíveis nos diferentes ambientes percorridos durante o processo de estabelecimento da infecção. Porém, é preciso mais estudos para inferir a relação dessa proteína ou mesmo do regulador YgiV na expressão de outros genes importantes durante esse momento para *S. Typhimurium*.

Figura 14: Análise do padrão de expressão do operon *visP/ygiV* através do ensaio de atividade de β -galactosidase, na presença dos açúcares como fonte de carbono em aerobiose.



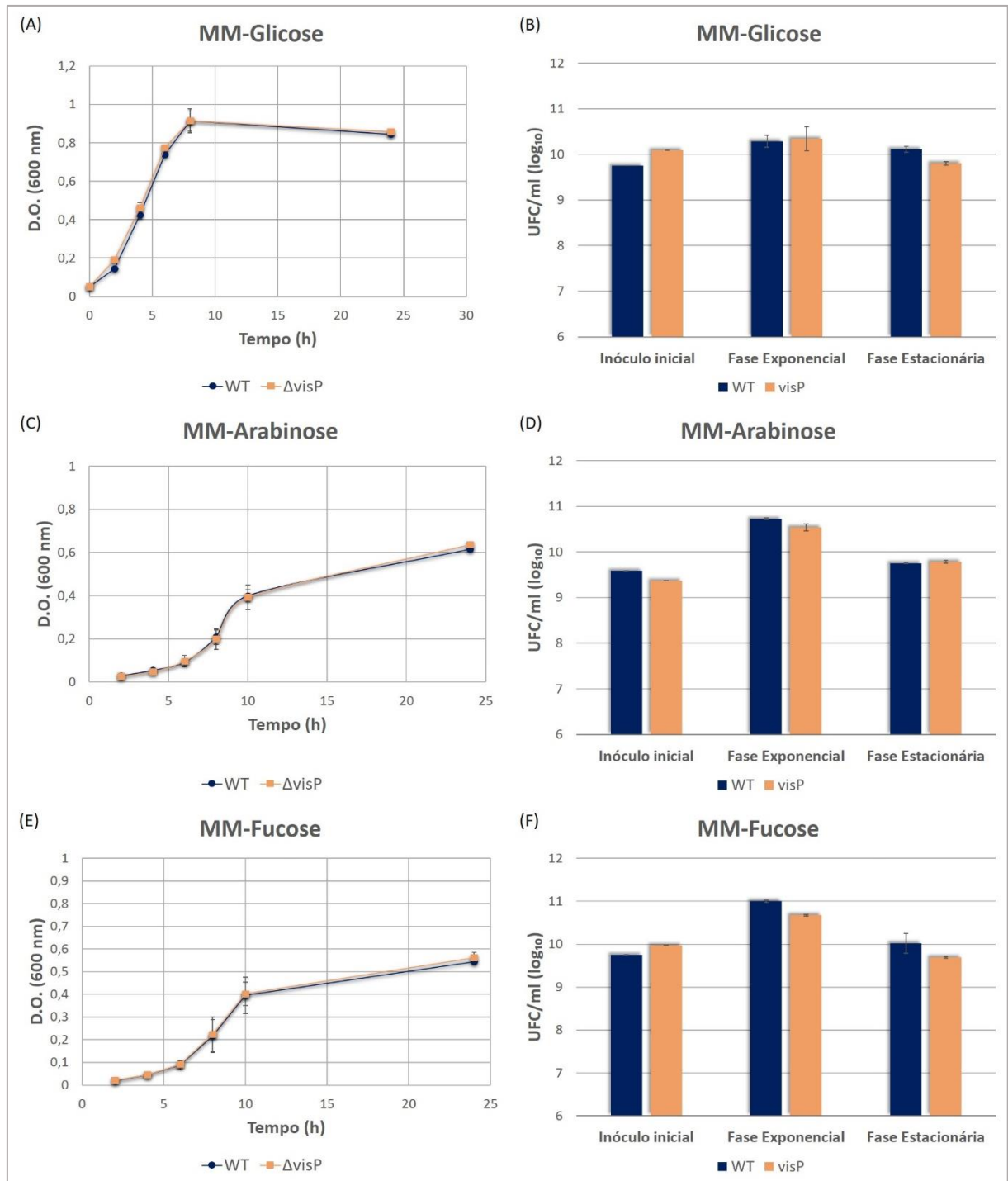
Análise correspondente as construções P1 e P4, em frente do gene repórter *lacZ* nas linhagens SL1344 (wt). O plasmídeo pRKlacZ sem promotor foi inserido na linhagem selvagem WT e foi utilizado como controle do ensaio resultando em cerca de 200 unidades de Miller. **(A)** Ensaio realizado em fase exponencial. **(B)** Ensaio realizado em fase estacionária. Significância estatística comparando a condição em meio LB com a condição em meio mínimo com os diferentes açúcares para cada construção, $p < 0,0001$ (****), $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*). Barras sem asterisco não houveram diferenças estatísticas significativas.

4.2 Diferentes açúcares como única fonte de carbono em baixas concentrações de oxigênio

Dados transcriptômicos mostram que os genes *visP* e *ygiV* tem um aumento na expressão em condições de anaerobiose e microaerofilia (KRÖGER; COLGAN; SRIKUMAR; HÄNDLER *et al.*, 2013), e dados transcriptômicos da linhagem $\Delta ygiV$ (dados não publicados do grupo de pesquisa) mostram algumas alterações na expressão de genes relacionados com metabolismo em anaerobiose, podendo estar relacionado então com o momento da infecção que *S. Typhimurium* encontra esse ambiente com restrição de oxigênio próximo ao lúmen intestinal. Então, foram feitos ensaios para avaliar a influência dos açúcares em baixas concentrações de oxigênio.

Em um primeiro momento, foram feitas curvas de crescimento em microaerofilia utilizando como fonte de carbono os açúcares: glicose, arabinose ou fucose, sendo esse último um dos açúcares liberados pela microbiota a partir das mucinas, estando presente próximo ao lúmen intestinal onde a disponibilidade de oxigênio é baixa (RIVERA-CHÁVEZ; LOPEZ; BÄUMLER, 2017). A figura 15 mostra que nenhum dos açúcares modificou as taxas de crescimento (D.O. 600nm) comparando as duas linhagens WT e mutante $\Delta visP$, assim como a viabilidade celular (UFC/ml) ao longo do período de crescimento. Então, em todas as condições testadas nesse estudo e com as diferentes fontes de carbono, a linhagem mutante $\Delta visP$ não apresentou diferenças no fenótipo de crescimento em relação à linhagem WT.

Figura 15: Avaliação da influência dos açúcares no crescimento e sobrevivência da linhagem SL1444 selvagem (WT) e mutante $\Delta visP$ em baixas concentrações de oxigênio.



Os açúcares foram utilizados, suplementando o meio mínimo com 0,4 %, como fonte de carbono para obter as curvas de crescimento (D.O. 600nm) e determinação de UFC/ml para sobrevivência. **(A)** Curva de crescimento com D-glicose. **(B)** Sobrevivência com D-glicose. **(C)** Curva de crescimento com L-arabinose. **(D)** Sobrevivência com L-arabinose. **(E)** Curva de crescimento com L-fucose. **(F)** Sobrevivência com L-Fucose. Não houveram diferenças estatísticas significativas em comparação com a linhagem selvagem (WT) nessas condições.

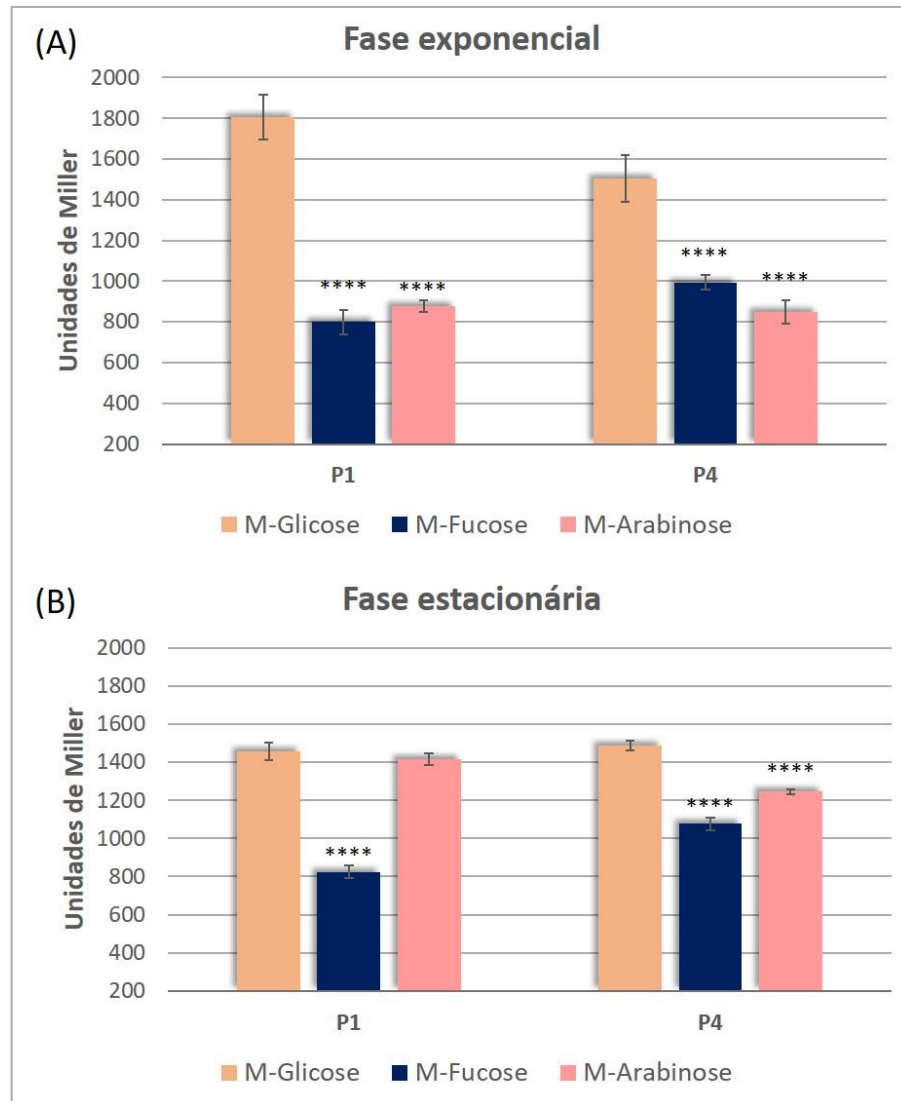
Em seguida, foi investigado o padrão de expressão dos promotores dos operon *visP/ygiV*, se os açúcares como única fonte de carbono teriam influência na transcrição do operon, nessas condições. Pode-se observar na figura 16 que na presença de glicose há um pequeno aumento na da expressão na fase exponencial em relação à fase estacionária observado apenas na construção P1.

Durante a fase exponencial (Figura 16A), comparando os açúcares com a glicose, houve uma significativa diferença na expressão de ambas as construções com os açúcares testados. Desta forma podemos dizer que, nessa condição, a glicose aumenta a expressão dos promotores e que as outras diferentes fontes de carbono testadas em anaerobiose não alteram significativamente essa expressão, em fase exponencial.

Na fase estacionária (Figura 16B) a construção P1 não apresenta diferença de expressão na condição com arabinose em relação à glicose, como ocorre em fase exponencial (Figura 16A), e o padrão de expressão da construção P1 na condição com fucose não apresenta diferença significativa em relação à fase exponencial (Figura 16B). A construção P4 apresenta diferença de expressão na presença de todos os açúcares testados em relação à glicose (Figura 16B) e na presença de arabinose pode-se observar diferença na expressão em relação à fase exponencial (Figura 16).

Em todas as condições diferenciais testadas há uma expressão considerável dos promotores desta região cromossomal, principalmente em fase estacionária, indicando que o operon *visP/ygiV* está sendo requisitado na célula nessas condições, porém a relação direta desse operon com a ausência ou restrição de oxigênio ainda não foi elucidada.

Figura 16: Análise do padrão de expressão do operon *visP/ygiV* através do ensaio de atividade de β -galactosidase, na presença dos açúcares como fonte de carbono com restrição de oxigênio.



Análise correspondente as construções P1 e P4, em frente do gene repórter *lacZ* nas linhagens SL1344 (wt). O plasmídeo pRK*lacZ* sem promotor foi inserido na linhagem selvagem WT e foi utilizado como controle do ensaio resultando em cerca de 250 unidades de Miller. **(A)** Ensaio realizado em fase exponencial. **(B)** Ensaio realizado em fase estacionária. Significância estatística comparando a condição em meio mínimo com glicose com os outros açúcares para cada construção, $p < 0,0001$ (****). Barras sem asterisco não houveram diferenças estatísticas significativas.

4.3 Transcriptoma do mutante Δ *visP* via RNAseq

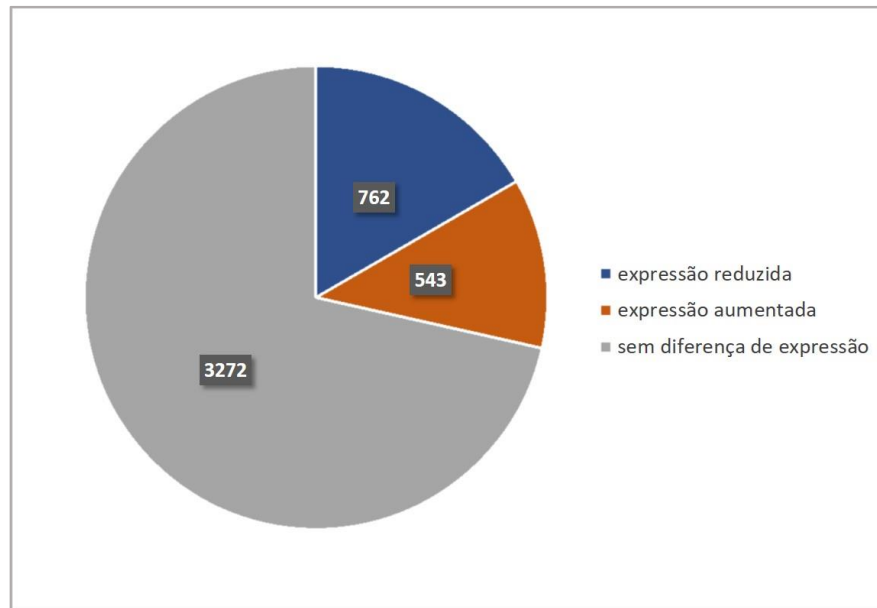
Estudo anteriores demonstraram a importância da proteína VisP na patogênese de *S. Typhimurium*, já que a ausência de VisP reduziu a virulência do patógeno em ensaios *in vivo*, com camundongos C57BL/6 (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013) e modificações importantes na patogênese relacionada aos

distintos comprimentos da cadeia de antígeno-O (DA SILVA; MANIERI; HERRERA; TRENT *et al.*, 2018). Essa proeína desempenha um papel nas funções celulares básicas, como manutenção da, metabolismo e resposta ao estresse (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). Porém a influência dessa proteína na expressão de outros genes importantes para esse patógeno ainda demanda maiores estudos, devido à sua característica pleiotrópica. Portanto, durante esse estudo foi realizado o estudo da regulação gênica via RNAseq da linhagem mutante $\Delta visP$, comparando os níveis de expressão à linhagem WT.

O transcriptoma foi analisado comparando a linhagem mutante $\Delta visP$ com a WT. Foram então avaliados e identificados os genes diferencialmente expressos na linhagem $\Delta visP$ em relação à linhagem selvagem de *S. Typhimurium* (Figura 17 e 18).

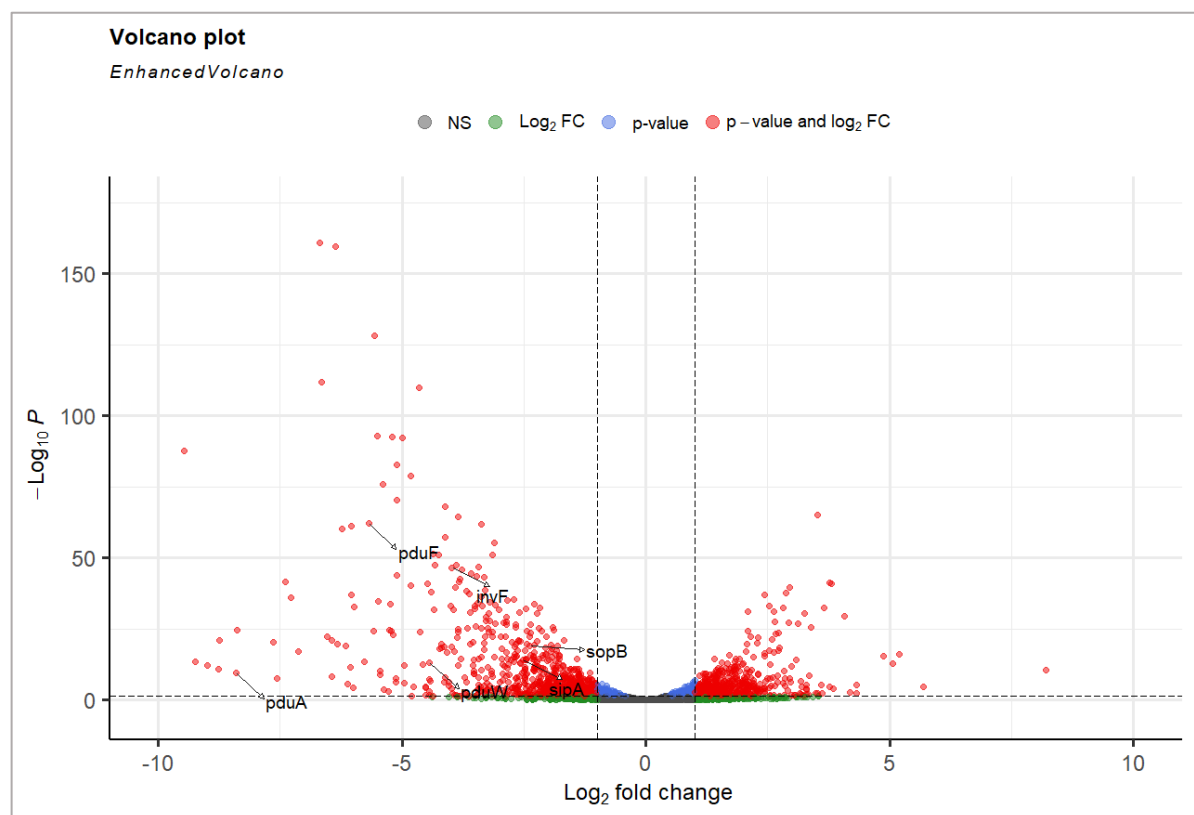
A linhagem mutante $\Delta visP$ apresentou 1305 transcritos diferencialmente expressos em relação à WT, em condição com LB em aerobiose (Figura 17). Os dados transcriptômicos mostram que a ausência de VisP tem grande influência na expressão de genes de patogenicidade e relacionados a vias metabólicas (Figura 18). Desse total, 762 transcritos apresentaram redução da expressão e 543 o aumento da expressão em relação à WT (Figura 17).

Figura 17: Transcritos diferencialmente expressos comparando a linhagem mutante $\Delta visP$ com a SL1344 WT.



Número total de transcritos identificados no sequenciamento e transcritos diferencialmente expressos. Comparação de diferencialmente expressos e número total de transcritos.

Figura 18: Volcano plot de 4577 transcritos identificados no RNAseq.

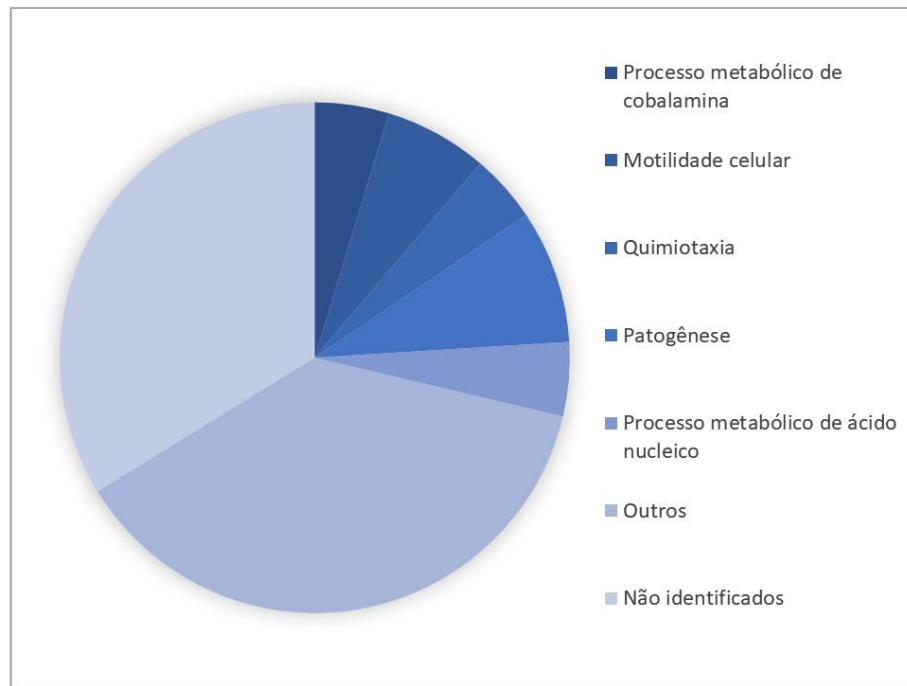


Foram caracterizados 1.305 transcritos como diferencialmente expressos (marcação vermelha) pelo teste de Wald seguido de análise de *False Discovery Rate*. Os genes destacados apresentam maior diferença de expressão ao comparar a linhagem $\Delta visP$ com a amostra WT, além de apresentar tendência na ontologia gênica.

Foi realizada uma ontologia gênica, conforme descrito previamente, dos 1305 transcritos diferencialmente expressos, como mostram as figuras 19 e 20. Entre os agrupamentos de genes com expressão reduzida podemos destacar os genes relacionados à motilidade, quimiotaxia, processos metabólicos de cobalamina e patogênese (Figura 19), sendo que grande parte dos relacionados à patogênese pertencem à SPI-1, assim como genes codificantes de proteínas efetoras do TTSS3 de SPI-1 (Figura 21). Dentre os agrupamentos de genes com expressão aumentada podemos ressaltar os genes relacionados à processos metabólicos, transporte transmembrana e respiração celular (Figura 20).

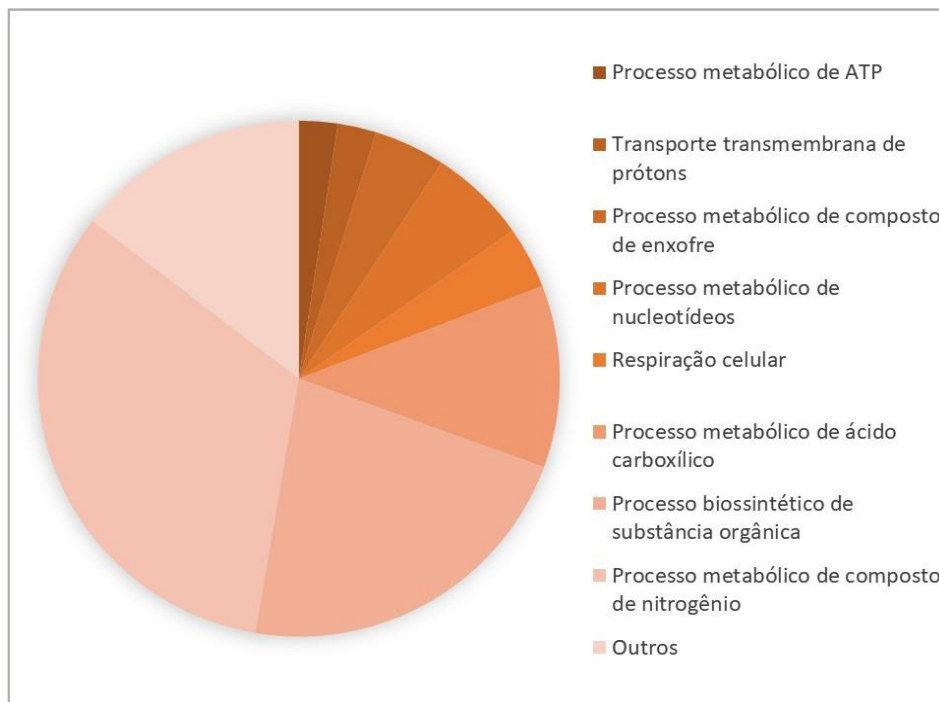
Entre os genes apresentados na figura 18, podemos destacar aqueles relacionados ao mecanismo de invasão (SPI-1 e efetores) e genes relacionados à utilização do metabólito 1,2 PD. Na condição desse ensaio, 41 genes de SPI-1 e seus efetores tiveram expressão reduzida na linhagem mutante $\Delta visP$ em relação à WT (Figura 21), assim como os genes do operon *pdu*, relacionados ao metabolismo de 1,2 PD (Figura 21). Ambos os mecanismos são essenciais para o estabelecimento da infecção por *S. Typhimurium*, já que a invasão é um processo imprescindível para a virulência e patogenicidade dessa bactéria (FRIEBEL; ILCHMANN; AEPFELBACHER; EHRBAR *et al.*, 2001; PATEL; GALÁN, 2006; ZHOU; CHEN; HERNANDEZ; SHEARS *et al.*, 2001), e a utilização de 1,2 PD pode conferir vantagens metabólicas sobre a microbiota no lúmen intestinal (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017). Os dados reforçam a importância da proteína VisP no periplasma da *S. Typhimurium*, e corrobora com resultados anteriores em que a linhagem mutante é menos virulento em comparação à WT (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013), sendo que sua ausência influencia na virulência e metabolismo desse patógeno (Figuras 17, 18, 19, 20 e 21).

Figura 19: Ontologia gênica dos transcritos com expressão reduzida no mutante $\Delta visP$ relativo à amostra selvagem.



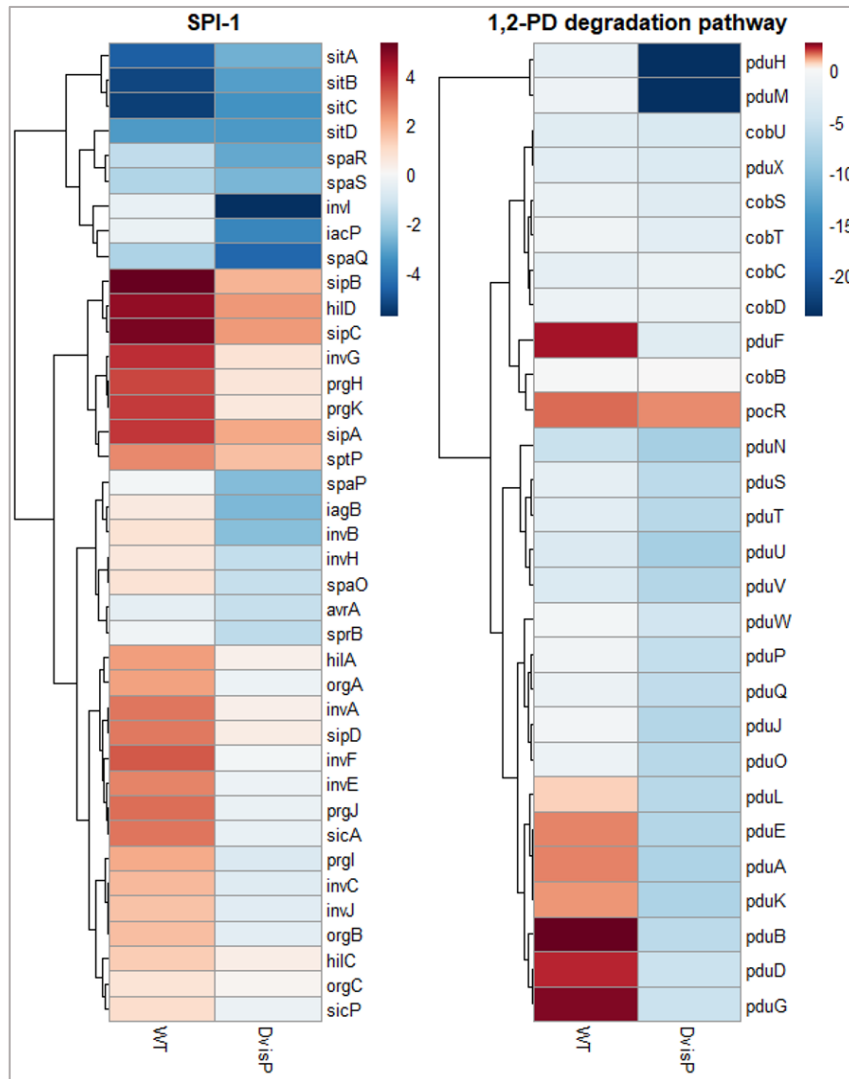
Genes com nível de expressão reduzidos na amostra mutante $\Delta visP$. Ontologia gênica feita através da plataforma online PANTHER.

Figura 20: Ontologia gênica dos transcritos com expressão aumentada no mutante $\Delta visP$ relativo à amostra selvagem.



Genes com nível de expressão aumentados na amostra mutante $\Delta visP$. Ontologia gênica feita através da plataforma online PANTHER.

Figura 21: Heatmap dos níveis de expressão dos genes relacionados pertencentes à SPI-1 e genes da via de degradação de 1,2 PD.



Valores da expressão de genes pertencentes a SPI-1 (esquerda) e genes da via de degradação 1,2 - PD (direita) comparando os níveis de WT e mutante $\Delta visP$ com agrupamento hierárquico de genes.

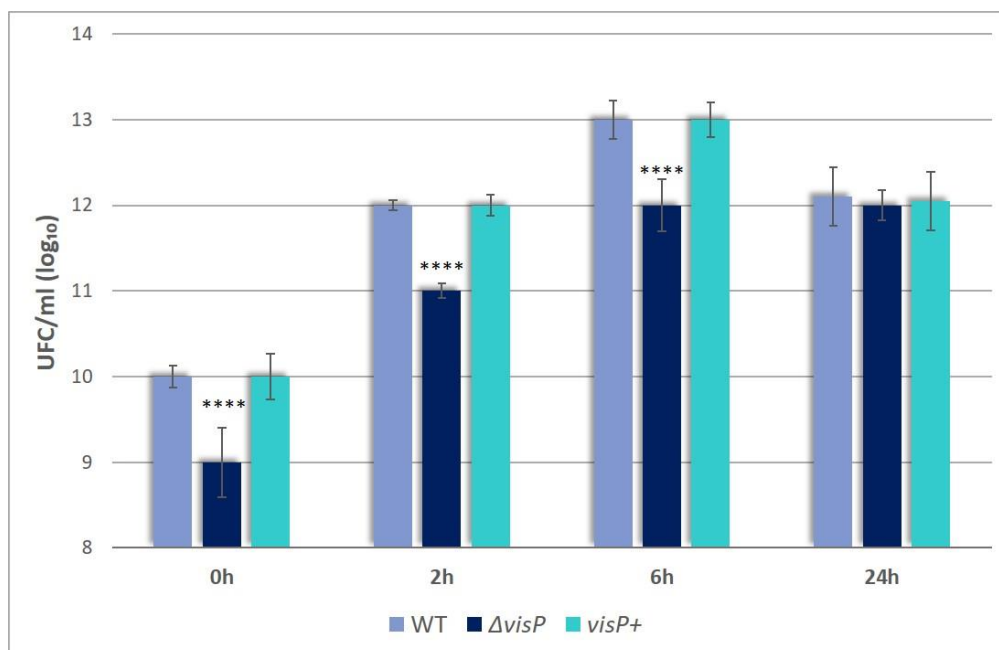
4.4 Relação de *visP* com a expressão de genes relacionados ao metabolismo de 1,2 PD

Uma variedade de subprodutos metabólicos pode ser produzida pela microbiota (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016; FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017; THIENNIMITR; WINTER; WINTER; XAVIER *et al.*, 2011). E, a exploração desses subprodutos como nutrientes e sinais é crucial para o sucesso da infecção por *S. Typhimurium*, pois dá uma vantagem na competição por nutrientes com os membros da microbiota. Conforme demonstrado pelos dados do transcriptoma (Figuras 18 e 21), na ausência do VisP, genes relacionados ao metabolismo do 1,2

PD tiveram expressão significativamente reduzida. O uso do 1,2 PD pela *S. Typhimurium* confere uma vantagem no crescimento em relação à microbiota durante a inflamação, uma vez que a microbiota não possui vias metabólicas para utilização desse metabólito (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017). Além disso, estudos *in vivo* com camundongos mostraram que mutações no operon pdu conferem uma redução na virulência de *S. Typhimurium* (CONNER; HEITHOFF; JULIO; SINSHEIMER *et al.*, 1998; HEITHOFF; CONNER; HENTSCHEL; GOVANTES *et al.*, 1999). O 1,2 PD é produzido pela fermentação dos açúcares ramnose e fucose (OBRADORS; BADÍA; BALDOMÀ; AGUILAR, 1988), que também podem ser disponibilizados pela microbiota no lúmen intestinal.

Sendo assim, um teste de sobrevivência (viabilidade celular), por contagem de UFC, foi realizado na presença de 1,2-PD com restrição de oxigênio (Figura 22), para avaliar se a ausência de VisP tem influência sobre o uso de 1,2-PD como fonte de carbono e energia. As cepas foram previamente cultivadas em LB (condição aeróbia) até atingir D.O. 1,0 (600nm), pois o crescimento de *S. Typhimurium* com 1,2 PD na ausência de oxigênio só é possível quando o tetrationsato, que serve como um aceptor de elétrons terminal para essa respiração anaeróbia, é adicionado ao meio (PRICE-CARTER; TINGEY; BOBIK; ROTH, 2001). Em seguida, os cultivos foram centrifugados, ressuspensos em MM suplementado com 1,2 PD (40 mM) e incubados sob condições de restrição de oxigênio (jarra de anaerobiose). Os resultados mostram que a cepa mutante $\Delta visP$ teve menor viabilidade (UFC/ml) do que WT durante um período de incubação de 2 e 6 horas, e em 24 horas ambas as cepas mantiveram o mesmo padrão (Figura 22). Assim, o teste de sobrevivência determinou o período de incubação ideal para observar maiores diferenças entre as linhagens na presença de 1,2 PD (Figura 22).

Figura 22: Efeito do 1,2 PD como fonte de carbono na sobrevivência das linhagens.



O ensaio de sobrevivência foi realizado com cepas previamente cultivadas em LB, posteriormente incubadas com restrição de oxigênio em MM suplementado com 1,2 PD (40 mM), e plaqueadas em LB ágar para contagem de UFC, $p < 0,0001$ (****). Barras sem asterisco não houveram diferenças estatísticas significativas.

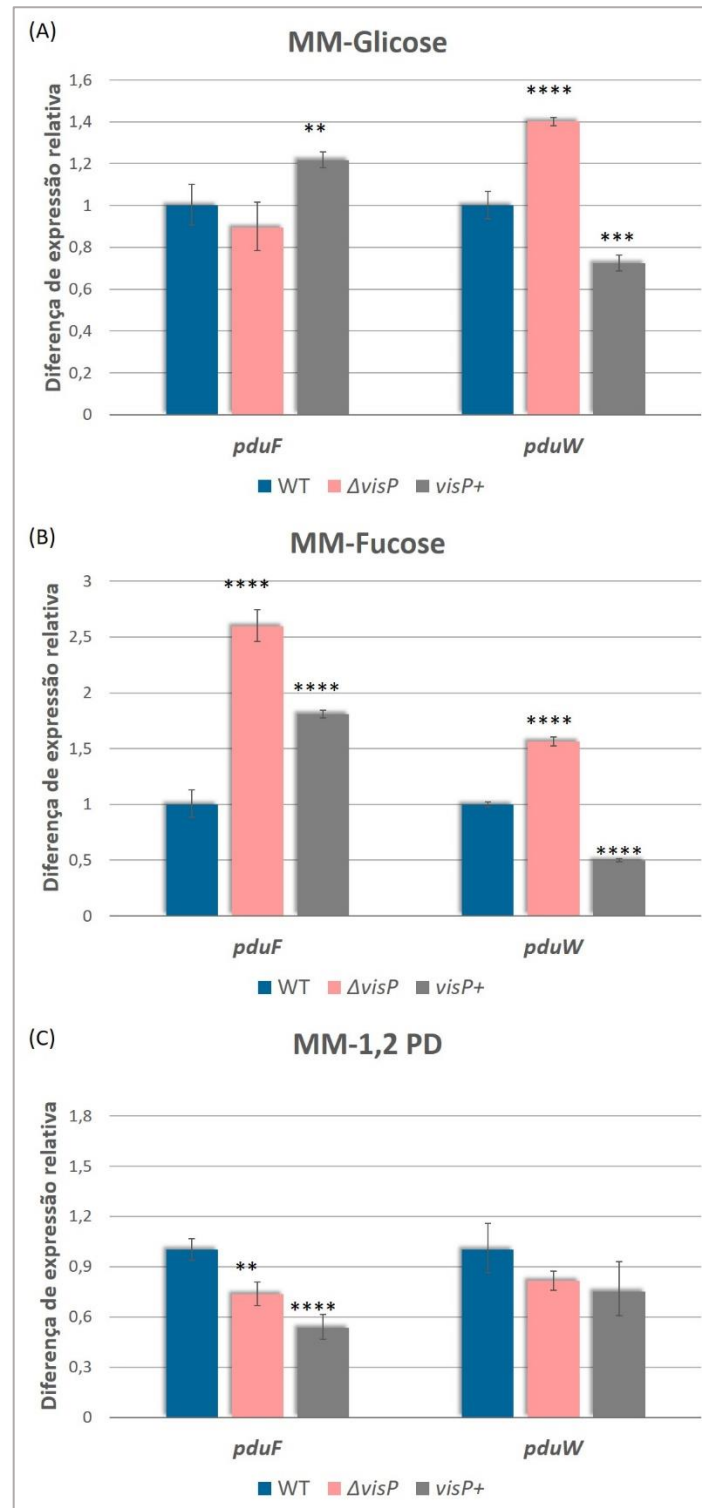
Em seguida, os níveis de expressão gênica das linhagens mutante $\Delta visP$, WT e da linhagem complementada *visP+* foram analisados via ensaio qRT-PCR para analisar o perfil de expressão dos genes *pdu* em diferentes condições. Os ensaios foram realizados sob restrição de oxigênio, para simular as condições do lúmen intestinal onde *S. Typhimurium* obtém vantagem na utilização desses subprodutos metabólicos gerados pela microbiota (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017), na presença de glicose, fucose e 1,2-PD como fonte de carbono. A extração das linhagens na presença de 1,2 PD foi realizada a partir da incubação por 6 horas, nas mesmas condições do teste de sobrevivência (Figura 22). Portanto, foram selecionados os genes *pduF* e *pduW*, conhecidos por participar do processo de utilização de 1,2 propanodiol (Figura 8). Sendo *PduF*, um facilitador de difusão do 1,2 PD (CHEN; ANDERSSON; ROTH, 1994), e *PduW*, uma propionato quinase, que é importante para a síntese de propionil coenzima A durante o crescimento em 1,2-PD (PALACIOS; STARAI; ESCALANTE-SEMERENA, 2003).

Os resultados mostram que na presença de glicose, não há diferença na expressão de *pduF* entre as linhagens mutante $\Delta visP$ e WT, mas *pduW* tem a expressão aumentada na linhagem mutante $\Delta visP$ em relação à WT (Figura 23A),

este resultado difere do perfil de expressão observado no RNAseq na condição com LB em aerobiose, onde ambos os genes apresentam expressão reduzida na mutante $\Delta visP$ (Figuras 18 e 21). A linhagem complementada $visP^+$ não recuperou os níveis de expressão da WT, mostrando um aumento na expressão de *pduF* em relação à mutante $\Delta visP$ e redução na expressão de *pduW* em relação à mutante $\Delta visP$ e WT (Figura 23A). Já na presença de fucose, os resultados mostram um aumento no nível de expressão de ambos os genes na linhagem mutante $\Delta visP$ em relação à WT (Figura 23B). Mais uma vez, a cepa complementada $visP^+$ não recuperou os níveis de expressão de WT, sendo que *pduW* apresenta expressão reduzida em relação à WT (Figura 23B). Na presença de 1,2-PD, o gene *pduF* apresentou expressão reduzida no mutante $\Delta visP$ em relação à WT (Figura 23C), bem como observado anteriormente no ensaio de RNAseq em condições distintas (Figuras 18 e 21). A linhagem complementada $visP^+$, por outro lado, não recuperou os níveis de expressão da cepa WT, mas apresentou uma expressão reduzida em comparação à WT e à linhagem mutante $\Delta visP$ (Figura 23C). Enquanto *pduW* não mostrou nenhuma diferença na expressão da mutante $\Delta visP$ quando comparada à WT, e a cepa complementada com $visP^+$ recuperou os níveis de expressão da WT (Figura 23C).

Portanto, a expressão dos genes *pduF* e *pduW* em condições de limitadas de oxigênio, como microaerofilia, teve um perfil distinto (Figura 23), com ambas as fontes de carbono testadas, quando comparadas com as condições de crescimento aeróbias em LB (Fig. 18 e 21). E, o uso de fucose como única fonte de carbono pode ter um papel regulador nesta via (Figura 23B) na ausência do gene *visP*. Até o momento, a relação entre a proteína periplasmática VisP e a via de degradação da 1,2-PD ou de outro metabólito não é conhecida. Sabe-se que VisP não é uma proteína reguladora, mas encontra-se no mesmo operon YgiV e ambas são co-transcritas (MERIGHI; SEPTER; CARROLL-PORTILLO; BHATIYA *et al.*, 2009), o que pode ser a correlação da expressão de *visP* com os genes do operon *pdu*.

Figura 23: Padrão de expressão dos genes *pdu* em diferentes condições de crescimento.



(A) Análise de qRT-PCR de genes *pdu* das linhagens cultivadas sob restrição de oxigênio em MM suplementado com D-glicose (0,4%). **(B)** Análise de qRT-PCR de genes *pdu* das linhagens cultivadas sob restrição de oxigênio em MM suplementado com D-fucose (0,4%). **(C)** Análise de qRT-PCR de genes *pdu* das linhagens previamente cultivadas em LB, posteriormente ressuspensas em MM suplementado com 1,2-PD (40 mM) e incubadas sob restrição de oxigênio por 6 horas. $P < 0,01$ (**); $P < 0,001$ (***); $P < 0,0001$ (****). Barras sem asterisco não houveram diferenças estatísticas significativas.

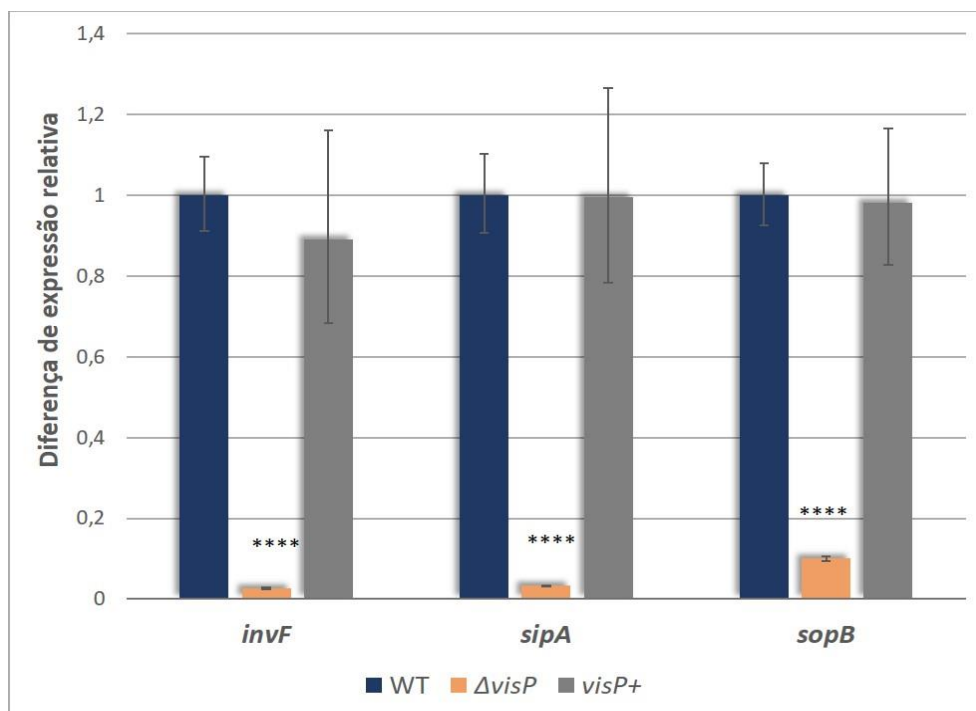
4.5 Influência de VisP no mecanismo de invasão de *S. Typhimurium* em diferentes condições

O mecanismo de invasão de *S. Typhimurium* é um importante fator de virulência responsável pelo estabelecimento da infecção por esse patógeno. Os dados do transcriptoma mostraram que na ausência do VisP muitos genes relacionados ao mecanismo de invasão tiveram expressão reduzida (Figuras 18). Portanto, foram realizadas análises de expressão gênica via qRT-PCR de genes relacionados ao mecanismo de invasão, para validar o perfil de expressão desses genes em diferentes condições.

Foram selecionados dessa via os genes *sipA*, *sopB* e *invF* (Figura 18). SipA é uma proteína de ligação à actina que aumenta a eficiência do processo de entrada de *Salmonella* nas células do hospedeiro, influenciando diferentes estágios no rearranjo do citoesqueleto de actina (ZHOU; MOOSEKER; GALÁN, 1999). SopB é uma proteína efetora externa, no qual o gene é codificado em SPI-5, também relacionada ao rearranjo do citoesqueleto e contribui para indução da inflamação modulando o tráfego de fagossomos (RAFFATELLU; WILSON; CHESSA; ANDREWS-POLYMENIS *et al.*, 2005). A indução de SPI-1 requer a expressão de *invF*, um regulador que ativa a transcrição de alguns genes dessa ilha (ALTIER, 2005; ELLERMEIER; SLAUCH, 2007; JONES, 2005).

O ensaio de qRT-PCR foi realizado na mesma condição do RNAseq (LB em aerobiose), para confirmar o resultado, e os dados mostram uma redução na expressão de ambos os genes testados na linhagem mutante $\Delta visP$ quando comparada à WT (Figura 24), corroborando com os dados do transcriptoma (Figura 18). Nesta condição, a linhagem complementada *visP*⁺ restaurou os níveis de expressão da WT (Figura 24).

Figura 24: Perfil de expressão gênica de genes relacionados ao mecanismo de invasão nas linhagens cultivadas com LB em aerobiose.



Análise de expressão gênica relativa via qRT-PCR. Significância estatística em comparação com a linhagem selvagem (WT), $p < 0,0001$ (****). Barras sem asterisco não houveram diferenças estatísticas significativas.

Em *S. Typhimurium* a SPI-1 promove a invasão nas células epiteliais (GALÁN; CURTISS, 1989; RAFFATELLU; WILSON; CHESSA; ANDREWS-POLYMENIS *et al.*, 2005), e esse mecanismo é altamente dependente do T3SS codificado na SPI-1 (GALÁN, 1996; SHEA; HENSEL; GLEESON; HOLDEN, 1996; ZHOU; CHEN; HERNANDEZ; SHEARS *et al.*, 2001). O locus SPI-1 contém genes que codificam proteínas efetoras e reguladoras do T3SS, tanto com papel no patógeno quanto no hospedeiro. Essas proteínas auxiliam no processo de invasão e são indispensáveis na eficiência desse processo, pois juntas lideram a reorganização dos filamentos de actina no processo de internalização (FRIEBEL; ILCHMANN; AEPFELBACHER; EHRBAR *et al.*, 2001; PATEL; GALÁN, 2006; ZHOU; CHEN; HERNANDEZ; SHEARS *et al.*, 2001). Além disso, para estabelecer a infecção, os patógenos entéricos viajam em diferentes ambientes com diferentes condições e disponibilidade de nutrientes (BÄUMLER; SPERANDIO, 2016; CAMERON; SPERANDIO, 2015). Portanto, além dos fatores de virulência, a capacidade metabólica de utilização desses diversos nutrientes presentes no hospedeiro, sejam eles provenientes da dieta ou metabólitos de sua microbiota, são

essenciais para o estabelecimento de um nicho ideal para a progressão da infecção (CAMERON; SPERANDIO, 2015; FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017).

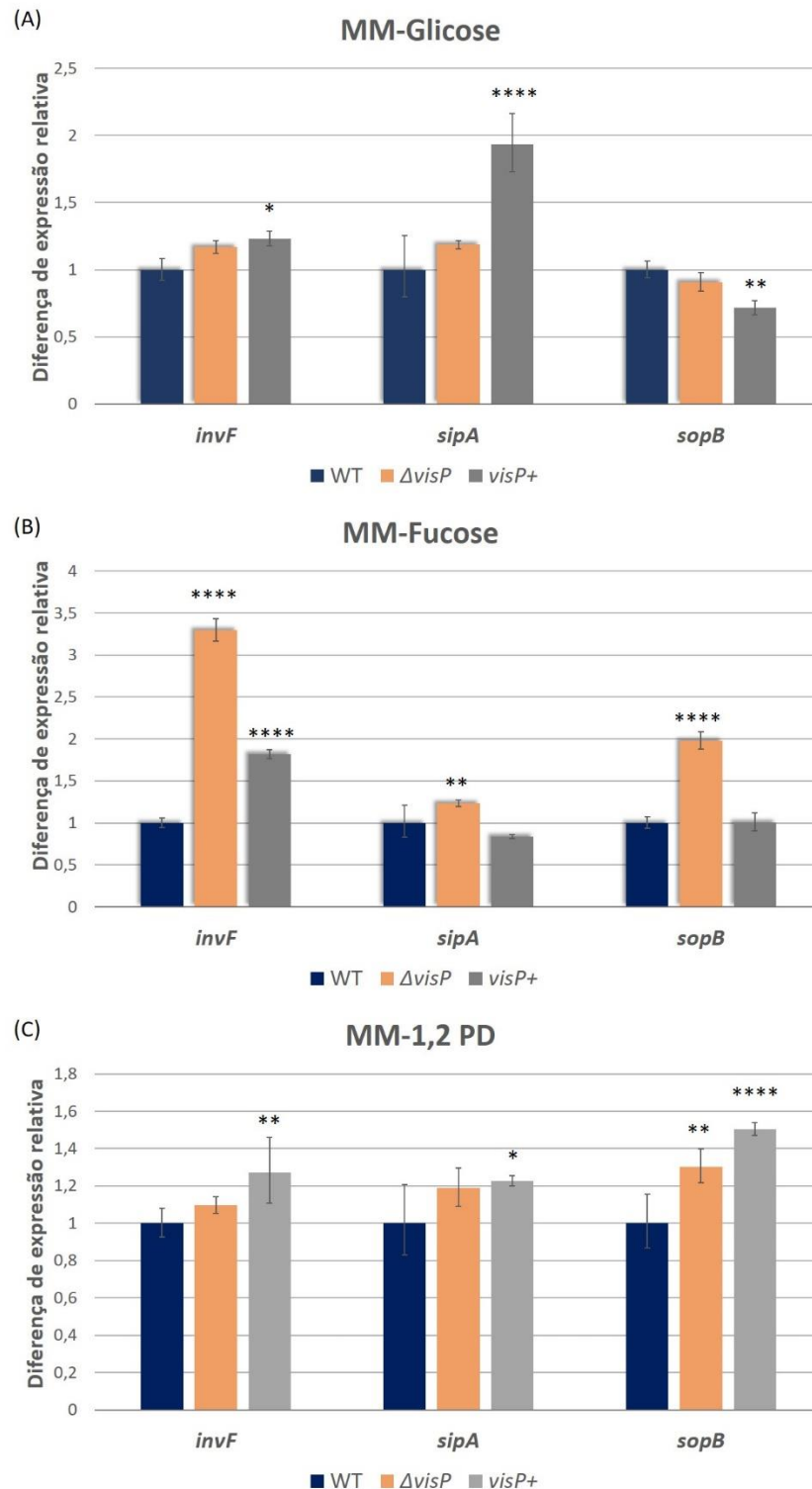
Então, o ensaio de qRT-PCR também foi realizado sob restrição de oxigênio na presença de glicose, fucose e 1,2-PD. A glicose foi utilizada como controle, por ser uma fonte preferencial de carbono no metabolismo de *S. Typhimurium* (Figura 25A). Os dados mostram que em condições com baixa concentração de oxigênio, diferentemente do LB em condição aeróbia, não há diferença de expressão entre as linhagens mutante $\Delta visP$ e WT (25A). A linhagem complementada *visP+* não apresentou os mesmos níveis de expressão que a cepa mutante e WT (Figura 25A).

Os açúcares liberados pela microbiota são nutrientes importantes para os patógenos entéricos no estabelecimento de sua infecção, pois os mesmos não possuem a capacidade enzimática de degradar estruturas de carboidratos complexos. No entanto, podem catabolizar esses açúcares liberados, promovendo sua expansão (MARCOBAL; SOUTHWICK; EARLE; SONNENBURG, 2013). Os glicanos da mucosa contêm vários resíduos de açúcar, como a fucose, que são liberados através do metabolismo da microbiota no lúmen intestinal (LARSSON; KARLSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2009). A degradação da fucose no lúmen intestinal gera 1,2-PD como subproduto, que é utilizado por *S. Typhimurium* como mecanismo alternativo sob condições de restrição de outras fontes de carbono (BADÍA; ROS; AGUILAR, 1985).

A condição com fucose sob baixa concentração de oxigênio foi testada (Figura 25B) para melhor avaliar se o perfil de expressão dos genes de invasão seria diferente na cepa mutante, uma vez que os genes que utilizam 1,2 PD apresentam expressão reduzida nesta linhagem. Os resultados mostram um aumento na expressão dos genes *invF* e *sopB* no mutante $\Delta visP$ quando comparado aos níveis de WT (Figura 25B). Nesta condição, a cepa complementada *visP+* restaurou os níveis de expressão de *sipA* e *sopB*, e um pequeno aumento na expressão do gene *invF* se comparado ao mutante $\Delta visP$ e a linhagem WT (Figura 25B). Em seguida, o perfil de expressão dos mesmos genes foi avaliado adicionando 1,2 PD após crescimento prévio em LB (Figura 25C). É possível observar que, assim como a condição com glicose, na presença de 1,2 PD não há diferenças significativas entre as linhagens mutante $\Delta visP$ e WT (Figura 25C), e a cepa complementada *visP+* não apresentou os mesmos níveis de expressão que a mutante $\Delta visP$ e WT,

apresentando um aumento no nível de expressão (Figura 25C). Sendo assim, apenas a adição de fucose como fonte de carbono aumentou a expressão de ambos os genes testados no mutante $\Delta visP$ em comparação com a cepa WT (Figura 25B), e a adição de 1, 2-PD aumenta a expressão de *sopB* (Figura 25C). Podemos inferir então que a fucose possui alguma participação na modulação do mecanismo de invasão na ausência de VisP.

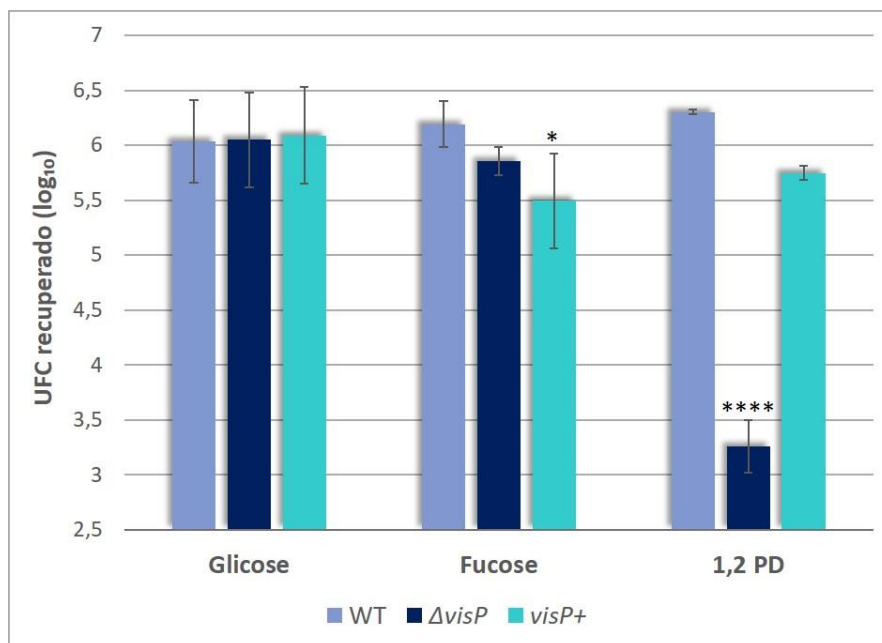
Figura 25: Padrão de expressão de genes relacionados ao mecanismo de invasão em diferentes condições de crescimento.



(A) Análise de qRT-PCR sob restrição de oxigênio em MM suplementado com D-glicose (0,4%). **(B)** Análise de qRT-PCR sob restrição de oxigênio em MM suplementado com D-fucose (0,4%). **(C)** Análise de qRT-PCR das linhagens previamente cultivadas em LB, posteriormente ressuspensas em MM suplementado com 1,2-PD (40 mM) e incubadas sob restrição de oxigênio por 6 horas. $P < 0,0001$ (****), $P < 0,01$ (**), $P < 0,05$ (*). Barras sem asterisco não houveram diferenças estatísticas significativas.

Por fim, foi avaliado o perfil de invasão das linhagens em células epiteliais HeLa na presença dos mesmos metabólitos. Glicose, fucose e 1,2-PD foram adicionados durante o teste de invasão: no momento em que as bactérias foram adicionadas e incubadas por 90 minutos com as células; e após esse período, na incubação por 3 horas. Os dados mostram que na presença de glicose não houve diferença na capacidade de invasão da cepa mutante em relação ao WT (Figura 26), conforme mostrado em estudos anteriores (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013), sendo essa a condição controle baseada no meio DMEM com alto teor de glicose (4500 g/L) comumente utilizado nesses ensaios (FIERER; ECKMANN; FANG; PFEIFER *et al.*, 1993; FINLAY; RUSCHKOWSKI; DEDHAR, 1991; PFEIFER; MARCUS; STEELE-MORTIMER; KNODLER *et al.*, 1999). O mesmo pode ser observado na presença de fucose (Figura 26), que não houve diferença na capacidade de invadir as células entre as linhagens. O que difere dos resultados em ensaios *in vivo* com camundongos C57BL/6, em que a linhagem $\Delta visP$ apresentou virulência reduzida (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). No entanto, na presença de 1,2 PD, a linhagem mutante $\Delta visP$ mostra uma redução significativa na capacidade de invadir células epiteliais *in vitro* (Figura 26).

Figura 26: Invasão em células epiteliais HeLa em diferentes condições.



Invasão de células HeLa pelas linhagens WT, $\Delta visP$, e complementada $visP^+$ utilizando DMEM suplementado com D-glicose (4.5 g/L), L-fucose (4.5 g/L) ou 1,2 PD (40 mM). $P < 0,0001$ (****), $P < 0,05$ (*). Barras sem asterisco não houveram diferenças estatísticas significativas.

Sabe-se que o propionato, produto final da degradação de 1,2 PD mediada pelo operon *pdu* (BOBIK; XU; JETER; OTTO *et al.*, 1997; WALTER; AILION; ROTH, 1997), pode modular a expressão de genes relacionados ao mecanismo de invasão celular, principalmente genes SPI-1 (HUNG; GARNER; SLAUCH; DWYER *et al.*, 2013), e que o metabólito essencial para essa repressão é o propionil-CoA, que também é um intermediário da via de degradação do 1,2 PD (HUNG; GARNER; SLAUCH; DWYER *et al.*, 2013; PALACIOS; STARAI; ESCALANTE-SEMERENA, 2003). Essa regulação, mediada por propionato, pode correlacionar a redução na expressão dos genes do operon *pdu* na ausência de VisP com o mecanismo de invasão. Todas essas vias são requeridas por *S. Typhimurium* no ambiente do lúmen intestinal onde há restrição de nutrientes e oxigênio.

Podemos observar que a mudança na disponibilidade de oxigênio altera o padrão de expressão de ambos os genes testados, independentemente da fonte de carbono utilizada (Figura 25), chamando a atenção para os distintos gradientes de oxigênio encontrados *S. Typhimurium* no intestino. Dados transcriptômicos mostram que o gene *visP* possui significativo aumento na expressão em condições de baixas

concentrações de oxigênio (KRÖGER; COLGAN; SRIKUMAR; HÄNDLER *et al.*, 2013). Isso pode correlacionar a importância da proteína VisP com o período/momento da infecção que *S. Typhimurium* encontra condições parecidas próximo ao lúmen intestinal, e pode estar relacionada à modulação da expressão desses genes dependendo da disponibilidade de oxigênio. Os dados apresentados reforçam a importância de VisP durante o processo infeccioso no lúmen intestinal, onde a disponibilidade de nutrientes é restrita e a capacidade de utilizá-los é de grande importância.

Conclusão

Com os resultados obtidos é possível concluir que os açúcares e disponibilidade de nutrientes intestinais podem modular a expressão do operon *visP/ygiV*. Este operon apresenta dois promotores e ambos mostraram significativas alterações no padrão de expressão na presença de alguns dos açúcares em determinadas condições. Por outro lado, não foi observado nenhuma diferença em relação aos fenótipos de crescimento e sobrevivência das linhagens $\Delta visP$ e WT nessas condições testadas para a expressão. Provavelmente, as proteínas YgiV e VisP tenham uma participação alguma atividade da virulência ou em relação à estresse em *S. Typhimurium*, visto que seus genes são codificados no mesmo operon, portanto cotranscritos. Porém, são necessários mais estudos para elucidar a completa relação destas proteínas.

Quanto ao transcriptoma da linhagem mutante $\Delta visP$, podemos concluir que esse gene é de grande importância para a *S. Typhimurium*, visto o expressivo número de transcritos diferencialmente expressos que foi apresentado no presente estudo. Dentre estes destacamos os relacionados ao mecanismo de invasão e relacionados a via de degradação de 1,2 propanodiol.

A expressão dos genes do operon *pdu* apresentam perfis distintos dependendo da condição testada. Assim como os genes relacionados ao mecanismo de invasão. E, o uso de fucose como única fonte de carbono parece ter um papel regulador nessas vias. Porém, não é possível afirmar até o momento qual a relação entre a proteína periplasmática VisP e a via de degradação de 1,2-PD ou de outro metabólito, bem como a utilização de fucose e o mecanismo de invasão desse patógeno.

A ausência de VisP reduz a expressão dos genes de invasão, na condição com LB em aerobiose, mas esse perfil de expressão é alterado dependendo da condição testada, indicando que a mudança na disponibilidade de oxigênio e nutrientes possui importante papel na regulação desses genes. Ainda, na ausência de VisP a presença de 1,2 PD como fonte de carbono/nutriente reduz a capacidade de invasão de *S. Typhimurium*.

Em suma, nossos resultados destacam a importância da proteína VisP para processos metabólicos essenciais de *S. Typhimurium*, para que esse patógeno

sobreviva as diferentes disponibilidades de nutrientes encontradas no lúmen intestinal, adapte-se durante o processo infeccioso e obtenha vantagens essenciais na competição com a microbiota intestinal. O mecanismo completo de VisP durante a infecção por *S. Typhimurium* deve incluir a proteína reguladora YgiV e todos os meandros regulatórios aqui explorados para total compreensão deste complexo sistema, ainda correlacionado com o sistema de 2-componentes QseBC.

REFERÊNCIAS

- ALTIER, C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. **J Microbiol**, v. 43 Spec No, p. 85-92, Feb 2005.
- ALTIER, C.; SUYEMOTO, M.; LAWHON, S. D. Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion genes by *csrA*. **Infect Immun**, v. 68, n. 12, p. 6790-6797, Dec 2000.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169, Jan 2015.
- ANDERSON, C. J.; KENDALL, M. M. Seroovar Typhimurium Strategies for Host Adaptation. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1983, 2017.
- BADÍA, J.; ROS, J.; AGUILAR, J. Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella* Typhimurium and *Klebsiella pneumoniae*. **J Bacteriol**, v. 161, n. 1, p. 435-437, Jan 1985.
- BOBIK, T. A.; XU, Y.; JETER, R. M.; OTTO, K. E. *et al.* Propanediol utilization genes (*pdu*) of *Salmonella* typhimurium: three genes for the propanediol dehydratase. **J Bacteriol**, v. 179, n. 21, p. 6633-6639, Nov 1997.
- BOHNHOFF, M.; DRAKE, B. L.; MILLER, C. P. Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 86, n. 1, p. 132-137, May 1954.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, Aug 2014.
- BÄUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 85-93, Jul 06 2016.
- CAMERON, E. A.; SPERANDIO, V. Frenemies: Signaling and Nutritional Integration in Pathogen-Microbiota-Host Interactions. **Cell Host Microbe**, v. 18, n. 3, p. 275-284, Sep 2015.
- CHEN, P.; ANDERSSON, D. I.; ROTH, J. R. The control region of the *pdu/cob* regulon in *Salmonella* typhimurium. **J Bacteriol**, v. 176, n. 17, p. 5474-5482, Sep 1994.
- CIRILLO, D. M.; VALDIVIA, R. H.; MONACK, D. M.; FALKOW, S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 1, p. 175-188, Oct 1998.

CLARKE, M. B.; HUGHES, D. T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E. C. *et al.* The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 27, p. 10420-10425, Jul 2006.

CONNER, C. P.; HEITHOFF, D. M.; JULIO, S. M.; SINSHEIMER, R. L. *et al.* Differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 8, p. 4641-4645, Apr 1998.

DA SILVA, P. **Estudo da regulação transcricional por YgiV e da interação proteica de VisP na sinalização química e montagem do LPS na patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.** Orientador: MOREIRA, C. G. 2020. (Tese de doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

DA SILVA, P.; MANIERI, F. Z.; HERRERA, C. M.; TRENT, M. S. *et al.* Novel Role of VisP and the Wzz System during O-Antigen Assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathogenesis. **Infect Immun**, v. 86, n. 8, Aug 2018.

ELLERMEIER, C. D.; ELLERMEIER, J. R.; SLAUCH, J. M. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 3, p. 691-705, Aug 2005.

ELLERMEIER, J. R.; SLAUCH, J. M. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 24-29, Feb 2007.

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, n. 1, p. e1006129, 01 2017.

FABICH, A. J.; JONES, S. A.; CHOWDHURY, F. Z.; CERNOSEK, A. *et al.* Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. **Infect Immun**, v. 76, n. 3, p. 1143-1152, Mar 2008.

FERREYRA, J. A.; NG, K. M.; SONNENBURG, J. L. The Enteric Two-Step: nutritional strategies of bacterial pathogens within the gut. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 7, p. 993-1003, Jul 2014.

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, n. 12, p. 5231-5236, Dec 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, Jun 1991.

FOOKES, M.; SCHROEDER, G. N.; LANGRIDGE, G. C.; BLONDEL, C. J. *et al.* *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 8, p. e1002191, Aug 2011.

FRIEBEL, A.; ILCHMANN, H.; AEPFELBACHER, M.; EHRBAR, K. *et al.* SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. **J Biol Chem**, v. 276, n. 36, p. 34035-34040, Sep 2001.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 2, p. 308-341, Apr 2013.

GALÁN, J. E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. **Mol Microbiol**, v. 20, n. 2, p. 263-271, Apr 1996.

GALÁN, J. E.; CURTISS, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86, n. 16, p. 6383-6387, Aug 1989.

GINALSKI, K.; KINCH, L.; RYCHLEWSKI, L.; GRISHIN, N. V. BOF: a novel family of bacterial OB-fold proteins. **FEBS Lett**, v. 567, n. 2-3, p. 297-301, Jun 2004.

GUTNICK, D.; CALVO, J. M.; KLOPOTOWSKI, T.; AMES, B. N. Compounds which serve as the sole source of carbon or nitrogen for *Salmonella typhimurium* LT-2. **J Bacteriol**, v. 100, n. 1, p. 215-219, Oct 1969.

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. Salmonellae interplay with host cells. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 53-66, Jan 2008.

HAVEMANN, G. D.; SAMPSON, E. M.; BOBIK, T. A. PduA is a shell protein of polyhedral organelles involved in coenzyme B(12)-dependent degradation of 1,2-propanediol in *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. **J Bacteriol**, v. 184, n. 5, p. 1253-1261, Mar 2002.

HEITHOFF, D. M.; CONNER, C. P.; HENTSCHEL, U.; GOVANTES, F. *et al.* Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection. **J Bacteriol**, v. 181, n. 3, p. 799-807, Feb 1999.

HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. **Nature**, v. 291, n. 5812, p. 238-239, May 1981.

HUNG, C. C.; GARNER, C. D.; SLAUCH, J. M.; DWYER, Z. W. *et al.* The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HsdR. **Mol Microbiol**, v. 87, n. 5, p. 1045-1060, Mar 2013.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M. *et al.* Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**, v. 165, n. 7, p. 526-530, Sep 2014.

JONES, B. D. Salmonella invasion gene regulation: a story of environmental awareness. **J Microbiol**, v. 43 Spec No, p. 110-117, Feb 2005.

KHAN, C. M. The Dynamic Interactions between Salmonella and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. **Int Sch Res Notices**, 2014, p. 846049, 2014.

KOROPATKIN, N. M.; CAMERON, E. A.; MARTENS, E. C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 5, p. 323-335, Apr 2012.

KRÖGER, C.; COLGAN, A.; SRIKUMAR, S.; HÄNDLER, K. *et al.* An infection-relevant transcriptomic compendium for Salmonella enterica Serovar Typhimurium. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 6, p. 683-695, Dec 2013.

KRÖGER, C.; DILLON, S. C.; CAMERON, A. D.; PAPENFORT, K. *et al.* The transcriptional landscape and small RNAs of Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 20, p. E1277-1286, May 2012.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, Mar 2012.

LAROCK, D. L.; CHAUDHARY, A.; MILLER, S. I. Salmonellae interactions with host processes. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 191-205, Apr 2015.

LARSSON, J. M.; KARLSSON, H.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. **Glycobiology**, v. 19, n. 7, p. 756-766, Jul 2009.

LAWHON, S. D.; MAURER, R.; SUYEMOTO, M.; ALTIER, C. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. **Mol Microbiol**, v. 46, n. 5, p. 1451-1464, Dec 2002.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

MACK, D. R.; MICHAIL, S.; WEI, S.; MCDUGALL, L. *et al.* Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. **Am J Physiol**, v. 276, n. 4, p. G941-950, 04 1999.

MAIER, L.; VYAS, R.; CORDOVA, C. D.; LINDSAY, H. *et al.* Microbiota-derived hydrogen fuels *Salmonella* typhimurium invasion of the gut ecosystem. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 6, p. 641-651, Dec 2013.

MALTBY, R.; LEATHAM-JENSEN, M. P.; GIBSON, T.; COHEN, P. S. *et al.* Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53957, 2013.

MARCOBAL, A.; SOUTHWICK, A. M.; EARLE, K. A.; SONNENBURG, J. L. A refined palate: bacterial consumption of host glycans in the gut. **Glycobiology**, v. 23, n. 9, p. 1038-1046, Sep 2013.

MARQUES, M. V.; GOMES, S. L.; GOBER, J. W. A gene coding for a putative sigma 54 activator is developmentally regulated in *Caulobacter crescentus*. **J Bacteriol**, v. 179, n. 17, p. 5502-5510, Sep 1997.

MARTENS, E. C.; CHIANG, H. C.; GORDON, J. I. Mucosal Glycan Foraging Enhances Fitness and Transmission of a Saccharolytic Human Gut Bacterial Symbiont. **Cell Host Microbe**, v. 4, n. 5, p. 447-457, Nov 13 2008.

MERIGHI, M.; SEPTER, A. N.; CARROLL-PORTILLO, A.; BHATIYA, A. *et al.* Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *In: BMC Microbiol*, v. 9, p. 42, 2009.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; HUANG, X.; EBERT, D. *et al.* Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). **Nat Protoc**, v. 14, n. 3, p. 703-721, 03 2019.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.

MOREIRA, C. G.; HERRERA, C. M.; NEEDHAM, B. D.; PARKER, C. T. *et al.* Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 4, p. 1470-1475, Jan 22 2013.

MOREIRA, C. G.; SPERANDIO, V. Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. **Infect Immun**, v. 80, n. 12, p. 4344-4353, Dec 2012.

MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 914-926, Mar 2010.

NG, K. M.; FERREYRA, J. A.; HIGGINBOTTOM, S. K.; LYNCH, J. B. *et al.* Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. **Nature**, v. 502, n. 7469, p. 96-99, Oct 3 2013.

OBRADORS, N.; BADÍA, J.; BALDOMÀ, L.; AGUILAR, J. Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1,2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. **J Bacteriol**, v. 170, n. 5, p. 2159-2162, May 1988.

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, n. 15, p. 7800-7804, Jul 1996.

PACHECO, A. R.; CURTIS, M. M.; RITCHIE, J. M.; MUNERA, D. *et al.* Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. **Nature**, v. 492, n. 7427, p. 113-117, Dec 2012.

PALACIOS, S.; STARAI, V. J.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Propionyl coenzyme A is a common intermediate in the 1,2-propanediol and propionate catabolic pathways needed for expression of the prpBCDE operon during growth of *Salmonella enterica* on 1,2-propanediol. **J Bacteriol**, v. 185, n. 9, p. 2802-2810, May 2003.

PATEL, J. C.; GALÁN, J. E. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. **J Cell Biol**, v. 175, n. 3, p. 453-463, Nov 2006.

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, n. 11, p. 5690-5698, Nov 1999.

PRICE-CARTER, M.; TINGEY, J.; BOBIK, T. A.; ROTH, J. R. The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. **J Bacteriol**, v. 183, n. 8, p. 2463-2475, Apr 2001.

RAFFATELLU, M.; WILSON, R. P.; CHESSA, D.; ANDREWS-POLYMENIS, H. *et al.* SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 146-154, Jan 2005.

RASKO, D. A.; MOREIRA, C. G.; LI, D. R.; READING, N. C. *et al.* Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, v. 321, n. 5892, p. 1078-1080, Aug 2008.

READING, N. C.; TORRES, A. G.; KENDALL, M. M.; HUGHES, D. T. *et al.* A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. **J Bacteriol**, v. 189, n. 6, p. 2468-2476, Mar 2007.

RIVERA-CHÁVEZ, F.; LOPEZ, C. A.; BÄUMLER, A. J. Oxygen as a driver of gut dysbiosis. **Free Radic Biol Med**, v. 105, p. 93-101, 04 2017.

SANTOS, R. L.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J.; ADAMS, L. G. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 1, p. 3-12, Jan 2003.

SASSONE-CORSI, M.; RAFFATELLU, M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. **J Immunol**, v. 194, n. 9, p. 4081-4087, May 2015.

SHARON, G.; GARG, N.; DEBELIUS, J.; KNIGHT, R. *et al.* Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. **Cell Metab**, v. 20, n. 5, p. 719-730, Nov 2014.

SHEA, J. E.; HENSEL, M.; GLEESON, C.; HOLDEN, D. W. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 6, p. 2593-2597, Mar 1996.

SONNENBURG, J. L.; XU, J.; LEIP, D. D.; CHEN, C. H. *et al.* Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1955-1959, Mar 2005.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P. *et al.* Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8951-8956, Jul 2003.

THIENNIMITR, P.; WINTER, S. E.; WINTER, M. G.; XAVIER, M. N. *et al.* Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 42, p. 17480-17485, Oct 2011.

WALTER, D.; AILION, M.; ROTH, J. Genetic characterization of the pdu operon: use of 1,2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. **J Bacteriol**, v. 179, n. 4, p. 1013-1022, Feb 1997.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5445-5455, Oct 2006.

XU, J.; BJURSELL, M. K.; HIMROD, J.; DENG, S. *et al.* A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2074-2076, Mar 2003.

YANG, J.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. **Trends Microbiol**, v.19, n. 3, p. 128-135, Mar 2011.

YOO, W.; KIM, D.; YOON, H.; RYU, S. Enzyme IANtr Regulates *Salmonella* Invasion Via 1,2-Propanediol And Propionate Catabolism. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44827, 2017/03/23 2017.

ZHANG, X.-S.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; WOOD, T. K. *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA). **The ISME Journal**, v. 2, n. 6, p. 615-631, 2008/06/01 2008.

ZHOU, D.; CHEN, L. M.; HERNANDEZ, L.; SHEARS, S. B. *et al.* A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. **Mol Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 248-259, Jan 2001.

ZHOU, D.; MOOSEKER, M. S.; GALÁN, J. E. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. **Science**, v. 283, n. 5410, p. 2092-2095, Mar 26 1999.