

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA



Análise do crescimento bacteriano *in vitro* diferenciado de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em ambientes extra- e intracelular.

Karla Gaban Pereira Rodrigues

Araraquara

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Análise do crescimento bacteriano *in vitro* diferenciado de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em ambiente extra- e intracelular.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista para a
obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica.

Karla Gaban Pereira Rodrigues

Graduanda

Profº. Dr. Cristiano Gallina Moreira

Orientador

Araraquara

2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram no caminho que decidi trilhar, me dando forças para seguir em frente e enfrentar cada dificuldade encontrada pelo caminho com fé e determinação, e nunca desistir. Obrigada por todo o amor e dedicação, por sempre estarem por perto para me apoiar e por me ajudarem a realizar mais este sonho. Sem vocês, eu não estaria aqui hoje e não seria quem eu sou.

Às minhas irmãs, por sempre estarem presentes na minha vida, tornando-a mais alegre e brilhante, e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Saber que vocês torcem pelo meu sucesso me faz ter vontade de seguir em frente e crescer cada vez mais.

Aos meus avós, por seu apoio, orações e promessas. Vocês são a base das minhas virtudes e os exemplos que sempre segui. Desejo de todo o coração que vocês tenham orgulho de mim!

À família que fiz em Araraquara. Sem vocês para me apoiar, eu nunca conseguiria levar esta faculdade até o final. Obrigada por todos os intensivões de estudos com madrugadas em claro e à todos os momentos de alegria que me deram forças para voltar para Araraquara todo domingo durante cinco anos.

À todos os meus amigos da escola por me apoiarem e acreditarem em mim. Poder contar com vocês ao longo destes anos, mesmo com a distância e a falta de tempo atrapalhando, me fez entender o real significado da frase "amizade verdadeira"

A todos os meus colegas do laboratório de PASIQUIBAC, que me ajudaram e ensinaram tudo que sei de laboratório, além de fazerem das minhas tardes mais alegres e culturais. Sem vocês, eu nunca descobriria as maravilhas do Youtube e as verdades por trás de "Atirei o pau no gato".

Ao Profº. Dr. Cristiano Gallina Moreira, por aceitar ser meu orientador e me dar a oportunidade de trabalhar com ele. Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos e por ser a primeira pessoa a me ajudar a crescer profissionalmente.

*"Não são meus gestos que eu descrevo: sou eu,
é a minha essência."*

(Montaigne)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Crescimento Bacteriano.....	12
1.2	Sinalização Química em bactérias, ou Quorum Sensing	15
1.3	Processo infeccioso de <i>S. Typhimurium</i>	16
1.4	Objetivo do estudo	25
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	Obtenção do estoque de bactérias e seu armazenamento.....	26
2.2	Meios de cultivo para crescimento bacteriano	26
2.3	Cultivo do pré inóculo	27
2.4	Cultivo de inóculo e curva de crescimento em meios LB e N-mínimo	27
2.5	Análise dos dados	29
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1	Curva de crescimento de <i>S. Typhimurium</i> em meios LB caldo e N-mínimo	30
3.2	Curva de crescimento de <i>S. Typhimurium</i> em meio N-mínimo em diferentes concentrações de KH_2SO_4 e MgCl_2	31
3.3	Curva de crescimento de <i>S. Typhimurium</i> em meio N-mínimo em diferentes concentrações de KH_2SO_4 e MgCl_2 em diferentes pHs.	41
4	CONCLUSÃO.....	44
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMO

Salmonella enterica sorovar Typhimurium é uma bactéria intracelular que através da ingestão de água e alimentos contaminados causa salmonelose não tifoidal em uma grande variedade de hospedeiros. A doença é caracterizada principalmente por sintomas agudos de febre, dor abdominal, náusea e diarreia e seu tratamento consiste basicamente em reidratação. Entretanto, mesmo não sendo uma doença que inicialmente traga riscos de vida, a quantidade de pessoas diagnosticadas anualmente e o número de óbitos registrados por causa dela é um problema alarmante de saúde pública. Por estes motivos, o entendimento de todo o seu processo infeccioso é uma importante tarefa para que novas estratégias de defesa sejam desenvolvidas. Para poder ultrapassar as barreiras intestinais a bactéria precisa desenvolver múltiplos mecanismos, o que demonstra como é importante a identificação do que ocorre, e quando, ao longo deste processo. Para compreender melhor como estas bactérias se adaptam as condições adversas encontradas no hospedeiro foram feitas curvas de crescimento bacteriano distintas de cultivo em meios de cultura LB e N-mínimo, mimetizando o ambiente extra- e intracelular, respectivamente. Experimentos com diferenças de pH e de concentrações de íons como Mg^{+2} e PO_4^- buscaram averiguar o comportamento da bactéria às condições de stress bacteriano. Diante das curvas obtidas pode-se concluir que *S. Typhimurium* tem grande capacidade de adaptar-se as diferentes situações encontradas ao longo do seu ciclo de vida em hospedeiro, além de que Mg^{+2} desenvolve importante função no metabolismo celular bacteriano agindo de forma favorável a sua multiplicação, enquanto PO_4^- atua de maneiras distintas, ora estimulando ou inibindo o seu desenvolvimento, dependendo das condições em que se encontra.

Palavras-chave: *Salmonella Typhimurium*; N-mínimo; crescimento bacteriano; condições de stress; concentração de íons; pH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Curva de crescimento bacteriano.....	15
Figura 2 Células epiteliais e células M encontradas no intestino.	17
Figura 3 Processo de invasão de células epiteliais pela <i>S. Typhimurium</i>	20
Figura 4 Processo de maturação do fagossomo em macrófagos	21
Figura 5 Proteínas efetoras de <i>S. Typhimurium</i> que agem no processo de maturação do fagossomo.....	23
Figura 6 Processo infeccioso da <i>S. Typhimurium</i>	25
Figura 7 Ensaio de curva de crescimento de <i>S. Typhimurium</i> em LB caldo e N-mínimo.	31
Figura 8 Curva de crescimento bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> em N-mínimo contendo 1mM de KH_2PO_4 em diferentes concentrações de MgCl_2 empregadas.	33
Figura 9 Curva de crescimento bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> em N-mínimo contendo 100mM de KH_2PO_4 em diferentes concentrações de MgCl_2	34
Figura 10 Curva de crescimento bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> em N-mínimo contendo 200mM de KH_2PO_4 em diferentes concentrações de MgCl_2	35
Figura 11 Curva de crescimento bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> em N-mínimo contendo 10 μM de MgCl_2 em diferentes concentrações de KH_2PO_4	38
Figura 12 Curva de crescimento bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> em N-mínimo contendo 100 μM de MgCl_2 em diferentes concentrações de KH_2PO_4	39
Figura 13 Curva de crescimento bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> em N-mínimo contendo 200 μM de MgCl_2 em diferentes concentrações de KH_2PO_4	40
Figura 14 Curva de crescimento de <i>S. Typhimurium</i> cultivada em meio N-mínimo com diferentes concentrações de KH_2PO_4 e MgCl_2 e em diferentes pHs.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Combinações de concentrações de N-mínimo utilizadas ao longo do experimento. 28

LISTA DE ABREVIações

(NH₄)₂SO₄ - Sulfato de amônio
ATP - Trifosfato de adenosina
ATR - Acid Tolerance Response
Ca⁺² - Cálcio
D.O - Densidade óptica
DNA - Ácido desoxirribonucleico
H - Hora
HCl - Ácido clorídrico
K₂SO₄ - Sulfato de potássio
KH₂PO₄ - Fosfato de potássio
LB - Luria-Bertani
Mg⁺² - Magnésio
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
MHC II - Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL - Mililitros
NaOH - Hidróxido de sódio
nm - Nanômetros
PhoPQ - Sistema de dois componentes PhoPQ
QS - Quorum Sensing
RNA - Ácido ribonucleico
ROS - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
S. Typhimurium - *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium
SCV - *Salmonella*-containing vacuole
SifA - *Salmonella*-induced filaments A
SipC - Proteína de invasão C
SopB - *Salmonella* outer protein B
SopE - *Salmonella* outer protein E
SPI1 - *Salmonella* Pathogenicity Island 1
SPI2 - *Salmonella* Pathogenicity Island 2
T3SS - Type Three Secretion System

1 INTRODUÇÃO

O gênero bacteriano *Salmonella* foi inicialmente nomeado por seu descobridor Daniel Salmon em 1900. Caracteristicamente *Salmonella* é um patógeno intracelular pertencente a família Enterobacteriaceae e compreende bastonetes Gram-negativos, anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos, responsáveis por uma variedade de doenças causadas em animais e humanos, indo de gastroenterites à febre tifóide com risco de vida (YURIST-DOUTSCH *et al.*, 2016; TORTORA, 2012). As gastroenterites são formas mais brandas e auto-limitadas de salmonelose geralmente causadas por *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium, ou simplesmente *S. Typhimurium* (FERREIRA, 2005).

Devido a aspectos clínicos e patogênicos *Salmonella* também é conhecida como *Salmonella* não tifoidal (causadora de gastroenterites) e tifoidal (causadora de febre tifóide), e a sua nomenclatura difere das demais utilizadas para outros microrganismos, tendo mais de 2500 sorovariedades diferentes reconhecidas (também chamadas sorovares). É uma resistente bactéria que pode sobreviver por semanas em um ambiente seco e meses em água. Enquanto todos os sorovares podem causar a doença em animais, alguns possuem hospedeiros específicos e podem sobreviver apenas em uma ou algumas espécies, como por exemplo a *Salmonella* Dublin, que é um patógeno específico de gado (TORTORA, 2012; WHO, 2013).

A exposição a cepas de *Salmonella* não tifoidal se dá, geralmente, através da ingestão via oral tanto de água e carne de animais contaminados pelo patógeno, quanto por contaminação fecal. A doença é caracterizada por sintomas agudos de febre, dor abdominal, diarreia, náusea e em alguns casos vômito, e geralmente ocorrem entre 6 e 72 horas após a ingestão da carga bacteriana, prolongando-se normalmente por até 7 dias. Estes sintomas são relativamente brandos e o indivíduo tende a se recuperar sem precisar de um tratamento medicamentoso, apenas com a terapia de reidratação. Entretanto, em crianças pequenas e recém-nascidos, a salmonelose pode ser bastante grave, uma vez que a *Salmonella* pode atingir a corrente circulatória e através da infecção sistêmica provocar lesões em outros

órgãos. No adulto, algumas patologias pré-existentes podem agravar a doença (FERREIRA, 2005, TORTORA, 2012; WHO, 2013; YURIST-DOUTSCH *et al.*, 2016).

Atualmente, estima-se que aproximadamente 98.3 milhões de pessoas ao redor do mundo contraem salmonelose não tifoidal, e 155.000 indivíduos morrem por ano. Apesar destes elevados números, 60 a 80% de todos os casos de *Salmonella* não são reconhecidos, sendo classificados como casos esporádicos ou, na maioria das vezes, não diagnosticados corretamente. Além disso, a salmonelose não tifoidal gera um grande problema de saúde pública em países em desenvolvimento onde um grande número de crianças e infantes contam como vítimas, e em nações industrializadas onde a taxa de morbidade gera um grande impacto sócio-econômico (POIRIER e AV-GAY, 2015; HANSEN-WESTER e HENSEL, 2001; WHO, 2013).

Por estes e demais motivos, o controle de doenças bacterianas infecciosas em todo o mundo é uma importante tarefa. Mesmo com a revolução da medicina e a descoberta dos antibióticos, o crescente aumento da resistência destas bactérias e o aparecimento de novas cepas multi-resistentes reduziu a eficácia destes medicamentos. Esta tendência promove uma urgente necessidade de um melhor entendimento da patogenicidade das bactérias e seus mecanismos de resistência, promovendo assim novas estratégias de terapia e vacinação. Porém, para isso, é preciso que alguns conceitos e fundamentos fiquem claros, e que avancemos mais nas linhas de pesquisa, para que consigamos definir outros aspectos que ainda são nebulosos no mundo científico (POIRIER e AV-GAY, 2015).

1.1 Crescimento Bacteriano

As bactérias podem se reproduzir por diferentes métodos, como brotamento, fissão binária, fragmentação, entre outros, e como qualquer outro microorganismo, necessitam de nutrientes específicos para o seu crescimento e desenvolvimento. Os fatores necessários para o crescimento microbiano podem ser divididos em fatores físicos (temperatura, pH e pressão osmótica) e químicos (fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio, entre outros), sendo que suas especificações variam de acordo com o microorganismo. É importante deixar claro que, quando falamos em crescimento microbiano, estamos nos referindo ao aumento do número de células

microbianas viáveis, ou unidades formadoras de colônia (UFC), e não ao seu tamanho (TORTORA, 2012).

Por ser uma bactéria que se desenvolve dentro do corpo do hospedeiro, *S. Typhimurium* é classificada como mesófila, ou seja, sua temperatura ótima para crescimento é à 37°C. Além disso, por mais que seu pH ótimo para crescimento seja entre 6,5 e 7,5 ela desenvolveu a capacidade de sobreviver e se multiplicar em pH mais ácido, visando sobreviver aos diferentes ambientes e técnicas de defesa adotadas pelo organismo do hospedeiro. Outro fator determinante é a pressão osmótica, uma vez que quando elevada ela leva a plasmólise, ou seja, encolhimento do citoplasma celular, inibindo seu crescimento assim que a membrana plasmática se separa da parede celular (TORTORA, 2012).

Já fatores químicos são basicamente fontes de nutrientes e fatores orgânicos de crescimento, que de alguma forma, influenciam na multiplicação do microrganismo e por isso em laboratório estes nutrientes são fornecidos às bactérias pelo meio de cultura utilizado. Um dos principais é o carbono, elemento que pode ser obtido a partir de matérias orgânicas, como proteínas e carboidratos, e que constitui o esqueleto estrutural da matéria viva. Já o oxigênio age combinando-se com átomos de hidrogênio extraídos de compostos orgânicos para formar água, processo que fornece grande quantidade de energia ao mesmo tempo em que neutraliza um gás potencialmente tóxico. Porém, dependendo do micro-organismo, a sua presença pode ser tóxica ou não, e além destes, também existem bactérias como a *S. Typhimurium*, que desenvolveram a capacidade de continuar a crescer na presença ou ausência do oxigênio (TORTORA, 2012).

Outros elementos são necessários para sintetizar material celular, como DNA e proteínas. O fósforo é essencial para síntese de ácido nucléico e fosfolipídios das membranas celulares e nas ligações de energia do ATP. Já potássio, cálcio e magnésio são importantes cofatores para reações enzimáticas. Aminoácidos, purinas e pirimidinas são exemplos de compostos essenciais que não podem ser produzidos e por isto devem estar presentes no meio (TORTORA, 2012).

Quando o crescimento bacteriano é medido em função do tempo e em paralelo com as condições ambientais encontradas leva ao desenvolvimento do que

chamamos de Curva de Crescimento, que pode ser obtida graficamente quando a contagem da população de bactérias é feita em diferentes intervalos de tempo. Existem basicamente quatro fases de crescimento: fase lag, fase log, fase estacionária e a fase de morte celular (Fig. 1).

A fase Lag foi definida em 1914 por Pendolf como o intervalo de tempo entre a inoculação de uma cultura bacteriana e o início da sua taxa de crescimento; ou seja, foi determinada como o período de transição em que as células se adaptam aos novos nutrientes e condições do ambiente (ROBINSON, OCIO, KALOTI, et al 1998). Nesta fase, o número de células não se altera muito, uma vez que para se reproduzir elas primeiro precisam se adaptar as novas condições. Mesmo assim, neste período as células mantêm intensa atividade metabólica para a síntese de enzimas e outras moléculas (TORTORA, 2012).

A fase Log, ou logarítmica, também chamada de fase exponencial, é o período celular de maior atividade metabólica onde as células iniciam um processo de divisão celular e entram em uma fase de crescimento ou aumento logarítmico do número de bactérias - é a fase onde a reprodução celular é mais ativa. Nesta fase, o tempo de geração é constante e por isto sua representação logarítmica gera uma reta (TORTORA, 2012).

Após a formação de um grande número de células, os nutrientes do meio começam a se esgotar, e resíduos tóxicos provenientes da atividade metabólica das células começam a se depositar no meio. Estes fatores fazem com que a velocidade de multiplicação reduza e, conseqüentemente, o número de células novas diminui, ao mesmo tempo em que o número de células mortas aumenta, gerando assim um período de equilíbrio chamado fase estacionária (TORTORA, 2012).

A última fase é caracterizada pelo elevado número de células mortas ao mesmo tempo em que a multiplicação celular quase não ocorre mais, saindo do período de equilíbrio e entrando em uma fase de declínio logarítmico, denominada fase de morte celular. Esta fase perdura até que a população microbiana seja reduzida drasticamente ou completamente extinta (TORTORA, 2012).

Figura 1 Curva de crescimento bacteriano

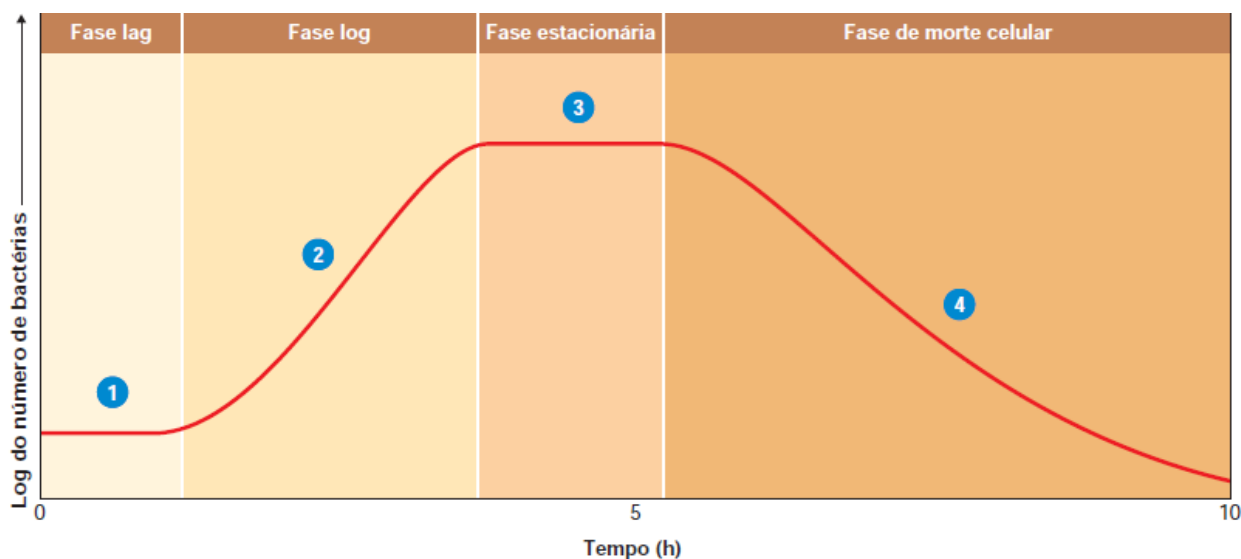


Fig. 1 Curva de crescimento bacteriano. Contagem do número de bactérias em função do tempo (Tortora *et al.*, 2012).

1.2 Sinalização Química em bactérias, ou Quorum Sensing

A sinalização química entre bactérias, também conhecida como Quorum Sensing (QS), foi descrita em um primeiro momento como o meio pelo qual a expressão de genes era coordenada dentro de uma comunidade bacteriana. Entretanto, recentes trabalhos e pesquisas trazem evidências de que QS não se restringe a comunicação entre células de bactérias, mas também permite a comunicação entre bactérias e seu respectivo hospedeiro (HUGHES e SPERANDIO, 2008).

Os mamíferos possuem em seu interior uma gigantesca flora bacteriana constituída por milhares de bactérias essenciais para absorção de nutrientes e desenvolvimento do sistema imune, mantendo assim uma relação simbiótica. Esta mutua beneficiação é possível graças a comunicação através de sinais químicos entre as células do hospedeiro e as células bacterianas - previamente definido como QS. Esta comunicação entre micro-organismos e seus hospedeiros se dá através de uma extensa gama de pequenas moléculas, como hormônios secretados pelo hospedeiro e diferentes substâncias químicas produzidas pelo patógeno. Estes sinais, entretanto, podem ser utilizados pelo patógeno para modificar sua expressão

gênica e ativar seus genes de virulência (HUGHES *et al.*, 2010; HUGHES e SPERANDIO, 2008).

O sistema imune do hospedeiro usa dos sinais produzidos pelas bactérias para identificar e responder a infecção bacteriana. Buscando contornar isto, as bactérias desenvolveram habilidades para escapar e manipular o sistema imune. Esta capacidade de adaptação das bactérias à mudanças no meio é comumente descrita como resposta ao stress e está conectada de alguma forma a sinalização química do hospedeiro (HUGHES e SPERANDIO, 2008).

Em *S. Typhimurium*, QS sofre influência de diversos fatores que buscam promover sua sobrevivência intracelular, como por exemplo, a ativação do sensor quinase bacteriano PhoQ ao se ligar à peptídeos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro, o que favorece a expressão de genes de virulência. Além da presença de peptídeos antimicrobianos, estudos indicam que a mudança de pH da célula do hospedeiro utilizada como mecanismo de defesa é mais uma importante condição que ativa muitos dos reguladores responsáveis pela virulência da bactéria (HUGHES e SPERANDIO, 2008; HARAGA *et al.*, 2008).

Entretanto, ao tempo que cada vez mais macromoléculas efetoras secretadas por patógenos são descobertas, o real mecanismo pelo qual o microrganismo consegue sobreviver, modificar e se replicar nos diferentes e inóspitos meios encontrados ao longo do processo infeccioso ainda é pouco elucidado (POIRIER e AV-GAY, 2014). Entender esta relação é um passo muito importante para entender a estruturação e interação entre células e sua patogenicidade (SURETTE e BASSLER, 1998).

1.3 Processo infeccioso de *S. Typhimurium*

Após ser ingerida pelo hospedeiro junto com o alimento, esses microrganismos encontram como primeira linha de defesa do corpo humano o pH ácido do estômago, responsável por eliminar diversos microrganismos, reduzindo a carga microbiana. Entretanto, como *S. Typhimurium* possui uma resposta adaptativa razoável com certo nível de tolerância ao meio ácido uma parcela destas bactérias é

capaz de sobreviver à essa barreira e avançar para o intestino (HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007; TORTORA, 2012).

Uma vez no intestino, composto principalmente por células epiteliais que possuem em sua superfície microvilosidades e células M, *S. Typhimurium* se locomove por ele usando seus flagelos ao mesmo tempo em que compete com os microrganismos da flora microbiana. Mesmo podendo invadir células epiteliais, *S. Typhimurium* parece ter uma preferência por invadir células M, uma vez que essas são apenas pragueadas e não possuem microvilosidades em sua superfície. Além disso, células M se localizam sobre as Placas de Peyer, para onde células dendríticas e linfócitos, como macrófagos, migram para reconhecer e capturar antígenos que estejam no interior do trato gastrointestinal (Fig. 2) (HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007; TORTORA, 2012).

Figura 2 Células epiteliais e células M encontradas no intestino.

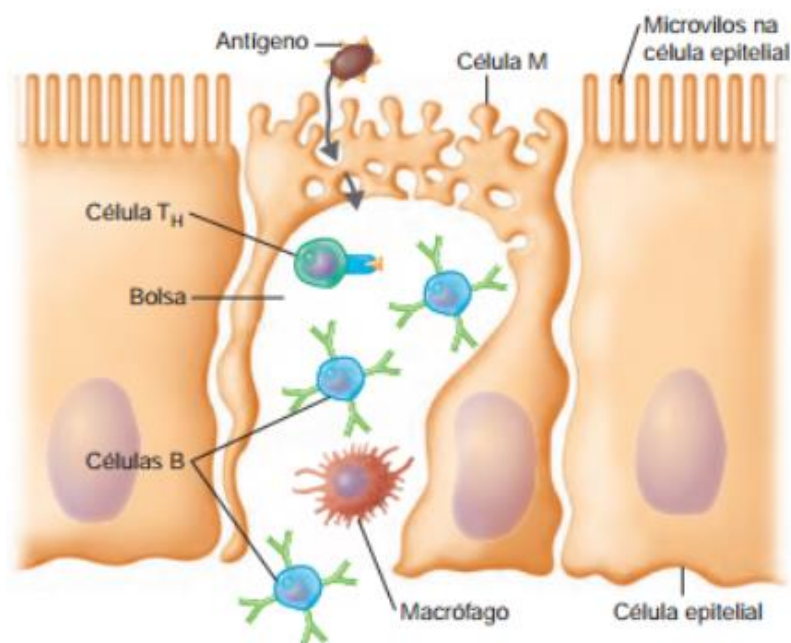


Fig. 2 Células encontradas no intestino. Células M estão localizadas acima das Placas de Peyer para onde migram macrófagos e demais células do sistema imune (TORTORA, 2012).

Após aderir a superfície da célula empregando fimbrias e adesinas de forma geral, *S. Typhimurium* começa seu processo de invasão celular. Uma das suas características mais importantes é a capacidade de invadir células não fagocíticas

mediando um processo de endocitose, no qual ela induz as células epiteliais a engolfá-la, semelhante ao processo de fagocitose (HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007; TORTORA, 2012; GALÁN *et al.*, 2001).

Este processo de invasão é mediado pelo Type Three Secretion System (T3SS) codificado pela *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI1), fundamental para sintomas tanto de gastroenterites como de infecção sistêmica. SPI1 se encontra em local específico do DNA da *Salmonella* e contém todos os genes necessários para gerar um T3SS funcional, além de diversos efetores e proteínas como SipC, SopB e SipA, que irão auxiliar no processo de invasão. A expressão dos genes localizados na SPI1 responde a estímulos ambientais e sua regulação envolve um processo complexo realizado por genes reguladores *hilC*, *hilA*, *hild* e *invF* (OLIVEIRA *et al.*, 2013; ELLERMEIER e SLAUCH, 2007).

T3SS é uma estrutura bacteriana complexa que forma uma espécie de agulha que permite à célula patogênica injetar proteínas efetoras bacterianas expressas por SPI1 dentro do citoplasma da célula do hospedeiro e então, controlar sua reação. A estrutura desta maquinaria é semelhante à do flagelo e consiste em uma base complexa que abrange a membrana interior e exterior da célula bacteriana e uma estrutura que se assemelha a uma longa agulha que se salienta no ambiente até que sua ponta alcance a célula hospedeira e a perfure, criando uma espécie de canal entre o citoplasma da célula eucariótica e o da célula procariótica por onde injetará as proteínas efetoras sem que estas sejam expostas ao meio extracelular. Consequentemente, estes sistemas ajudam em processos como invasão celular, sobrevivência intracelular e propagação do patógeno para as células vizinhas (NARIYA *et al.*, 2016; TORTORA, 2012; ELLERMEIER e SLAUCH, 2007; POIRIER e AV-GAY, 2015).

Estas proteínas efetoras expressas pelos genes contidos em SPI1 que são inseridas dentro da célula são responsáveis por alterar a função e o comportamento da célula hospedeira, promovendo diversas mudanças fisiológicas nas células que levam à reorganização da actina do seu citoesqueleto, ao enrugamento da membrana plasmática, que passa a se assemelhar a uma gota que se espalha ao atingir uma superfície sólida e por fim, ao engolfamento completo da célula

bacteriana pela célula hospedeira (TORTORA, 2012; ELLERMEIER e SLAUCH, 2007).

A invasão das células intestinais faz com que citocinas pró inflamatórias sejam liberadas. Estas induzem a uma resposta inflamatória aguda na mucosa intestinal buscando eliminar o patógeno, causando diarreia e, em situações mais críticas, a ulceração e destruição da mucosa intestinal. A destruição das microvilosidades presentes nas superfícies celulares reduz a capacidade destas de captarem íons, água e células do sistema imune, o que acaba por contribuir na indução da diarreia. Além disso, quando sofrem lise celular as células bacterianas liberam endotoxinas que contribuem para o desenvolvimento dos sintomas da doença (Fig. 3) (FERREIRA, 2005).

Ao ser engolfada pela célula hospedeira, uma espécie de camada protetora é formada pela membrana da célula epitelial ao redor do patógeno, denominada inicialmente como vacúolo. Assim que entra na célula, a bactéria passa a sentir o seu ambiente inóspito, assim como as defesas do hospedeiro passam a atacar seu vacúolo visando exterminá-la. Então, um segundo tipo de T3SS é codificado pela *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI2) e começa a injetar para fora de seu vacúolo uma série de diferentes proteínas efetoras que irão manipular algumas funções do hospedeiro e propriedades do vacúolo, que passa a ter a forma de uma membrana aderente e resistente, o *Salmonella*-containing vacuole (SCV). Todo esse processo faz com que a bactéria fique protegida contra as defesas do hospedeiro, ao mesmo tempo em que passa a se multiplicar em seu interior (HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

Figura 3 Processo de invasão de células epiteliais pela *S. Typhimurium*

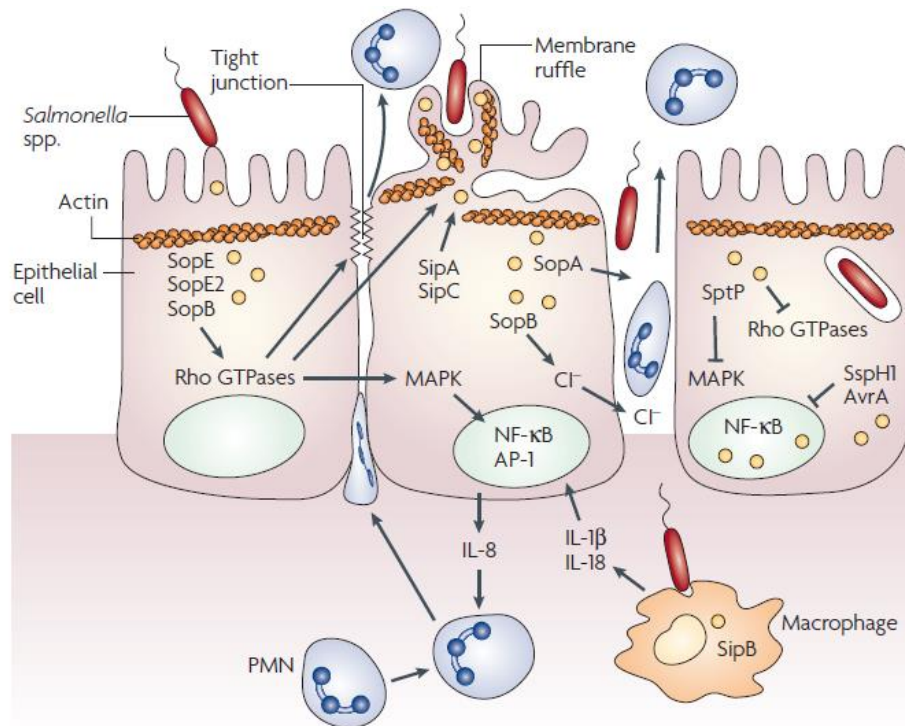


Fig. 3 Processo de invasão das células epiteliais pela bactéria. T3SS insere na célula do hospedeiro proteínas efetoras que farão com que esta engolfe a bactéria, ao tempo em que o sistema imune é ativado e desenvolve-se uma resposta inflamatória na mucosa intestinal (HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

Apesar de todo esse processo e estratégias desenvolvidas para escapar da morte celular, a maioria das infecções por *S. Typhimurium* não progride para outros locais além do intestino, ficando restrita a camada própria onde acabam sendo eliminadas pelos mecanismos de proteção do hospedeiro. Entretanto, existem casos de sorovares mais patogênicos que conseguem ultrapassar toda essa camada epitelial de células e chegar à submucosa, onde encontram células fagocíticas, principalmente macrófagos, que irão fagocitá-las para tentar evitar sua sobrevivência e proliferação para os demais órgãos (FERREIRA, 2005).

Uma vez capturado por um fagócito, o patógeno fica retido dentro de uma membrana plasmática que passa a ser denominada fagossomo. Este fagossomo tem sua composição modificada através de diversas fusões com vesículas da via endocítica, formando o fagolisossomo, organela com diferentes compostos antimicrobianos capazes de matar e degradar o patógeno internalizado. Este

processo é chamado de maturação do fagossomo e envolve uma queda gradual do pH dentro da célula e aquisição de características antimicrobianas além de, ao final da digestão do corpo estranho, apresentar na sua superfície celular antígenos específicos contra este tipo de patógeno para então iniciar a resposta imune (Fig.3) (POIRIER e AV-GAY, 2015).

Figura 4 Processo de maturação do fagossomo em macrófagos

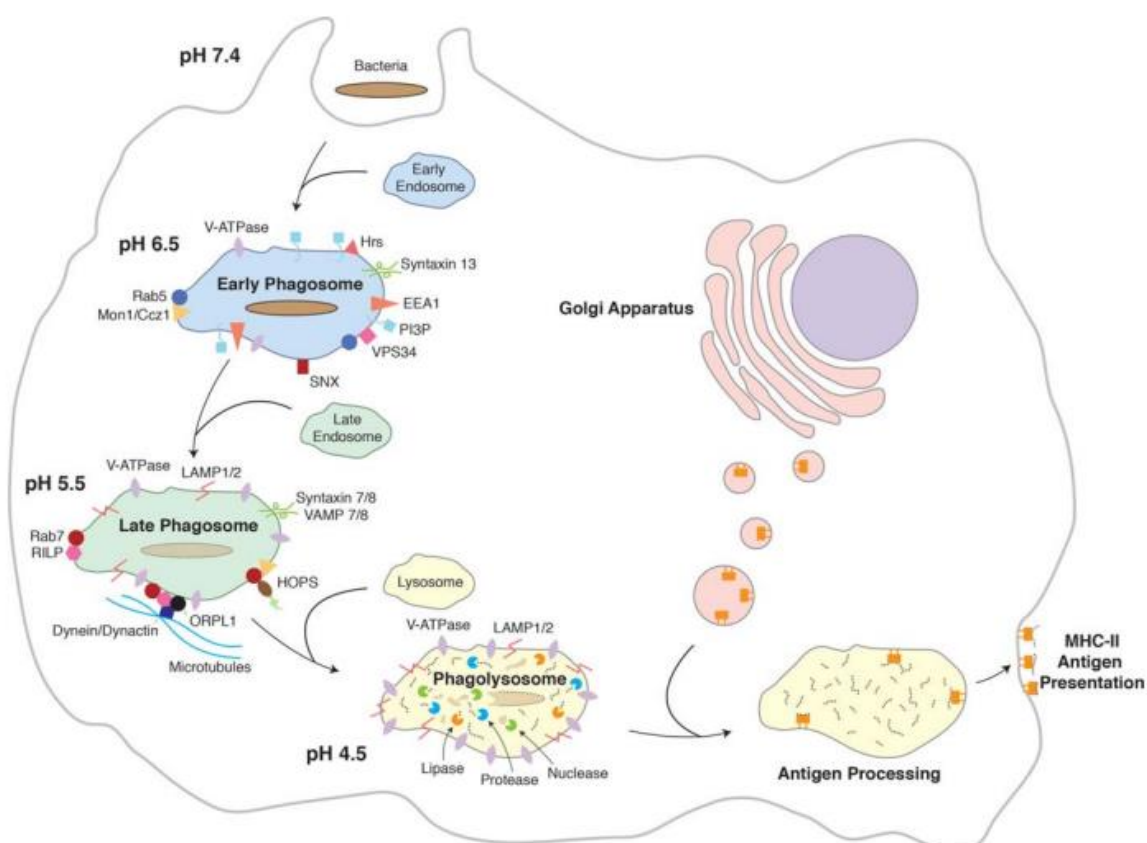


Fig. 4 Etapas do processo de maturação do fagossomo. Fusões ao longo do processo levam à formação do fagolisossomo. Este processo envolve redução do pH e formação de antígenos específicos contra o microrganismo (POIRIER e AV-GAY, 2015).

Como mecanismo de resistência a *Salmonella* desenvolveu estratégias para evitar este processo de maturação do fagossomo e usá-lo à seu favor, fazendo dos fagócitos vacúolos onde podem sobreviver e se multiplicar. Este processo demonstra que realmente existe uma sinalização entre a célula do hospedeiro e a célula invasora (QS). Entretanto, como esta interação bactéria-hospedeiro permite

ao patógeno interferir nas proteínas produzidas pelo hospedeiro, sobreviver e se replicar em um ambiente hostil ainda é pouco entendido.

Assim que é internalizado pelo macrófago o patógeno sente o ambiente inóspito fagossomal, que é caracterizado pelo pH ácido, baixas concentrações de magnésio e cálcio e a presença de peptídeos antimicrobianos e ROS (espécies reativas de oxigênio). Essas condições do fagossomo ativam SPI2 que codifica a formação de T3SS e expressa diferentes reguladores que estão inclusos no processo de virulência da *Salmonella* e ajudam a orquestrar a complexa cascata de eventos necessária para permitir a sobrevivência intracelular (POIRIER e AV-GAY, 2015; HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

A *S. Typhimurium* promove a fusão do fagossomo com o endossomo através de uma cascata de sinalização gerada pelas proteínas efetoras SopB e SopE para a aquisição de fatores adicionais que contribuem para a função microbiana. Porém, como o fagolisossomo possui um ambiente extremamente ácido (pH ácido de aproximadamente 4,5) que, em conjunto com enzimas hidrolíticas e oxidantes contribui para a degradação do microrganismo internalizado pela célula, a *S. Typhimurium* faz uso de diferentes proteínas e efetores para inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo (POIRIER e AV-GAY, 2015).

Figura 5 Proteínas efetoras de *S. Typhimurium* que agem no processo de maturação do fagossomo.

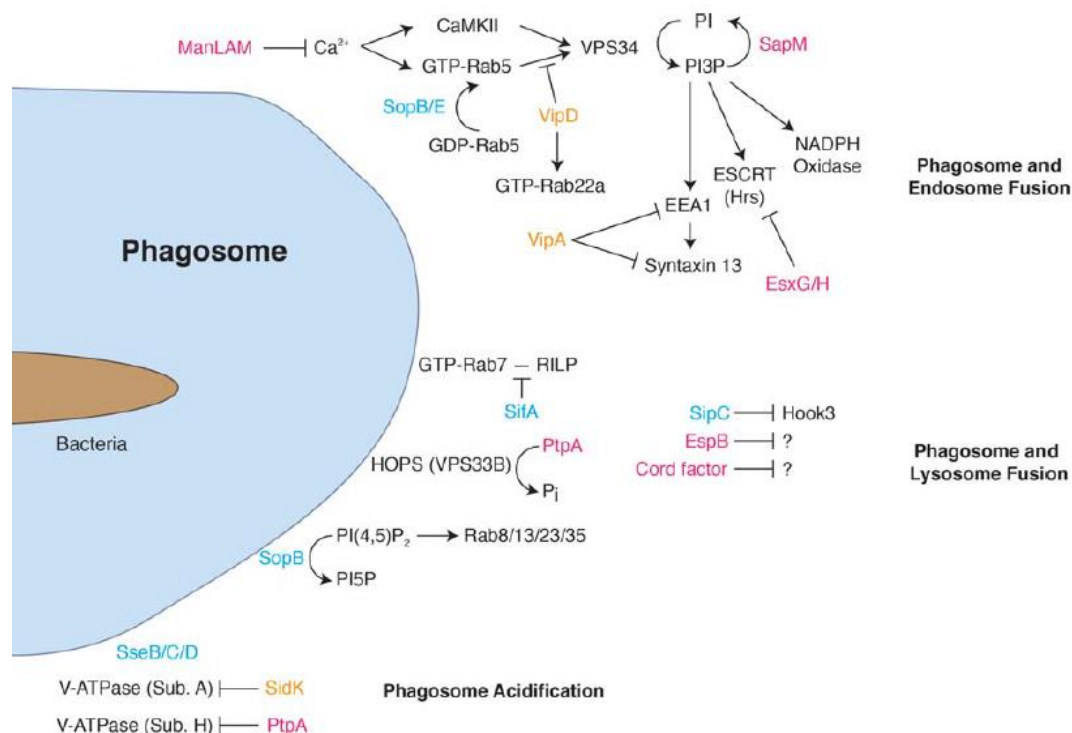


Fig.5 Efeitos microbianos interferindo no processo de maturação do fagossomo e na acidificação intracelular. Proteínas em azul representam fatores de virulência da *Salmonella*. O efector *Salmonella*-induced filaments A (SifA), a proteína de invasão C (SipC) e o efector SopB agem de diferentes maneiras bloqueando esta fusão. *Mycobacterium tuberculosis* secreta fatores de virulência (em rosa) como ManLAM e SapM que juntos impedem a maturação do fagossomo e sua fusão com o endossomo. VipD e VipA (em laranja) são efetores expressos pela bactéria *Legionella pneumophila* e agem interferindo ao longo do caminho percorrido pelo endossomo e consequentemente, impedindo a fusão deste com o fagossomo. (POIRIER e AV-GAY, 2015; HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

A acidificação do fagossomo se dá devido a bomba V-ATPase, um complexo protéico responsável por transportar prótons através da membrana. Esta acidificação tem diversos propósitos, como impedir o crescimento microbiano, ativar a hidrólise lisossomal que deve ocorrer em baixo pH, entre outros. As espécies de *Salmonella*, ao invés de impedirem de alguma forma esse processo de acidificação, abordam como estratégia para sobrevivência a adaptação ao baixo pH do fagossomo. Esta resposta adaptativa da *Salmonella* envolve a ativação de genes tolerantes à acidez que permitem a ela sobreviver em baixo pH. Uma vez exposta á esse pH mais ácido, a *Salmonella* secreta proteínas do sistema efetor B/C/D (SseB, SseC e SseD) na

sua superfície, onde elas formam um complexo e agem na translocação de efetores do T3SS pela membrana da bactéria (POIRIER e AV-GAY, 2015; HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

Além destas alternativas, a *Salmonella* desenvolveu outros meios para sobreviver a maturação e acidificação do fagossomo, como realocá-lo para uma posição em que ela consiga se replicar fora da via endocítica (POIRIER e AV-GAY, 2015; HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

Para se replicar, a *Salmonella* tem que estar localizada próxima ao Complexo de Golgi e, para que consiga se deslocar para lá, é necessário que uma rede de actina em volta do fagossomo seja criada, e para isso componentes como SipAC, Ssel, SspH2 e SpvB agem de diferentes maneiras para formá-la: primeiro levam a condensação da actina e ao rearranjo do citoesqueleto agrupando filamentos de actina, depois ocorre a formação de túbulos para que o fagossomo possa se posicionar próximo ao Complexo de Golgi, remodelando o citoesqueleto para poder modificar a forma da célula e permitir o movimento da vesícula e organelas e por último, impedindo a despolimerização dos filamentos de actina para que o fagossomo não volte para a região inicial (POIRIER e AV-GAY, 2015; HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

Quando próximo ao Complexo de Golgi, a maturação do fagossomo para e dá-se início a replicação da bactéria. Além disso, são formados longos filamentos de membranas (Sifs) que se estendem da célula e ajudam a aumentar o alargamento do fagossomo pela fusão com vesículas do Complexo de Golgi para poder acomodar as novas células geradas na replicação bacteriana que ocorre em seu interior (POIRIER e AV-GAY, 2015; HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

Após todo esse processo, quando a bactéria não é eliminada pelo macrófago ela tem seu número aumentado exponencialmente e é transportada por estas células até os linfonodos, provocando a septicemia da doença, ou seja, a presença das bactérias em outros órgãos e tecidos, como baço, fígado, meninges, etc. Assim, essa infecção pode variar de uma leve enterite à uma infecção sistêmica e até fatal (FERREIRA, 2005).

Figura 6 Processo infeccioso da *S. Typhimurium*

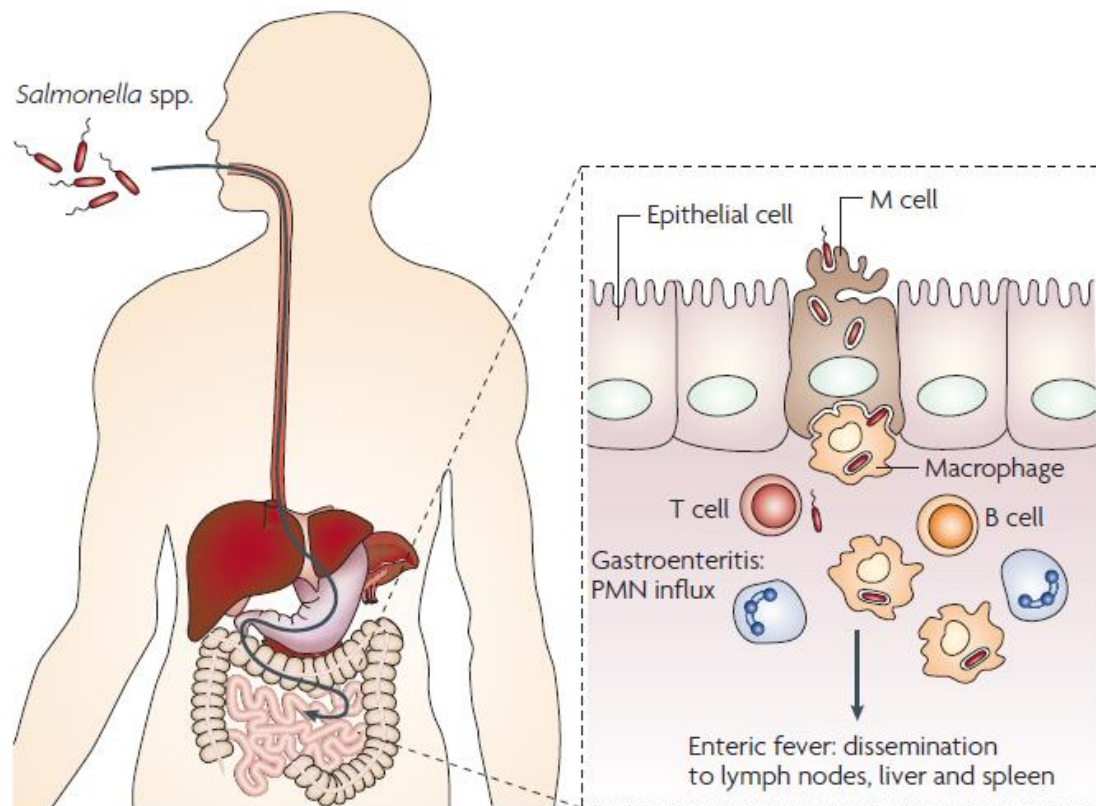


Fig. 6 Processo infeccioso da *Salmonella*, desde a invasão das células epiteliais do intestino até sua sobrevivência em macrófagos e proliferação em demais tecidos do corpo humano (HARAGA, OHLSON e MILLER, 2007).

1.4 Objetivo do estudo

Como foi relatado, *Salmonella* passa por diversas condições ao longo do seu processo infeccioso. Devido a isso, é razoável prever que *S. Typhimurium* passa por períodos de privação de diferentes nutrientes. Ademais, estes microrganismos tem a capacidade de sentir o local e condições em que se encontram dentro do hospedeiro e responder a ele através da expressão de diferentes e específicos genes responsáveis pela produção de proteínas e outros produtos necessários para a sua adaptação àquele ambiente. Por isso, entender como essa rede de informações entre meio e o patógeno se dá e como esta resposta adaptativa ocorre é essencial para conhecermos e compreendermos como é o processo de patogenicidade bacteriana.

Neste estudo foram feitos ensaios distintos de cultivo bacteriano *in vitro*, empregando meios de cultura que mimetizam respectivamente os ambientes extra- e intracelulares, além de condições de stress bacteriano, como diferenças de pH e de concentrações de íons como Mg^{+2} e PO_4^{-} , visando compreender melhor como estes microrganismos se adaptam às distintas condições adversas encontradas no hospedeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do estoque de bactérias e seu armazenamento

Inicialmente, foi feito o estoque da cepa bacteriana utilizada nos experimentos. A cepa utilizada foi a *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium da cepa protótipo de patogênese intestinal SL1344, conforme previamente descrita (Hoiseth e Stocker, 1981) e classificada como nº 3 da coleção de bactérias do Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana (PASQUIBAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, campus Araraquara.

Para fazer o estoque, 500µL de LB-glicerol (vol:vol) foram adicionados à um criotubo junto com 500µL do pré inóculo da bactéria, homogeneizados e então armazenados no *ultrafreezer* - 80°C.

2.2 Meios de cultivo para crescimento bacteriano

LB caldo foi o meio de cultivo escolhido para mimetizar o ambiente extracelular intestinal em que a bactéria se encontra antes do período de invasão, por ser um meio rico em nutrientes e por sempre proporcionar elevados níveis de crescimento bacteriano (Puente *et al.*, 2008). Visando minimizar discrepâncias em resultados e no crescimento estes foram sempre armazenados sobre as mesmas condições e os experimentos realizados no maior número possível de replicatas biológicas para obter significância estatística.

Em contrapartida, para podermos analisar as funções e respostas de componentes específicos, utilizamos também o meio N-mínimo, um meio pobre em nutrientes, onde se destacam baixas concentrações de magnésio e fosfato, e que

mimetiza o ambiente intracelular que a bactéria encontra ao invadir uma célula ou ser internalizada por um macrófago. Ele foi preparado contendo 5mM KCl, 7,5mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 mM K_2SO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 100 mM Tris-HCl, 10 μM MgCl_2 , 0,5% glicerol e 0,1% de ácido casamino em pH 5 para o crescimento das bactérias.

Ao longo do estudo, foram realizadas modificações nas concentrações de MgCl_2 (10 μM , 100 μM e 200 μM) e KH_2PO_4 (1 mM, 100mM e 200mM) além de mudanças no pH conforme indicadas nos experimentos, utilizando soluções de HCl para acidificar e NaOH para alcalinizar.

Todos os meios e soluções foram sempre submetidos a autoclavagem para esterilização, conforme previamente estabelecido, além de manipulados e mantidos de forma asséptica, respectivamente para uso e armazenagem.

2.3 Cultivo do pré inoculo

Partindo do estoque previamente obtido foram feitos pré inoculo bacterianos crescidos em tubo de ensaio com 8mL de meio LB caldo por 18 horas à 37°C com agitação e em condições aeróbicas.

2.4 Cultivo de inoculo e curva de crescimento em meios LB e N-mínimo

Deste pré inoculo obtido após cultivo *overnight* foi produzido o inoculo bacteriano. O inoculo foi realizado na relação de 1:20, com a adição de 1mL do pré inoculo e 19mL de meio (N-mínimo ou LB) em *erlenmayer* de 120mL. Para obter um resultado mais preciso e confiável, os testes foram sempre feitos em triplicatas biológicas. Além disso, para analisar como ocorria o crescimento sob as mesmas condições de cultivo mas em meios diferentes, as curvas de crescimento em N-mínimo e em caldo LB foram feitas em paralelo.

Após o preparo do inoculo, os *erlenmayers* foram então transferidos para *shaker* a 37°C por onde permaneceram durante as próximas 18 horas. Durante este período, foram retiradas amostras de 1mL de cada *erlenmayer* em tempos distintos para fazer a leitura da D.O. (densidade óptica) à 600nm em

espectrofotômetro. Baseado-se nas curvas de crescimento foram estabelecidos os seguintes tempos de leitura de D.O: 0,5 h (hora), 1h, 2h, 3h, 5h, 7h, 8h e 18h.

Durante o experimento, foram feitas combinações de diferentes concentrações de cloreto de magnésio e fosfato de potássio contidos no N-mínimo e em diferentes pH. As combinações feitas estão contidas na Tabela 1.

Tabela 1 Combinações de concentrações de N-mínimo utilizadas ao longo do experimento.

Meio de cultura N-mínimo		
Concentração de $MgCl_2$	Concentração de KH_2PO_4	pH
10 μ M	1mM	5,0
10 μ M	100 mM	5,0
10 μ M	200 mM	5,0
100 μ M	1mM	5,0
100 μ M	100 mM	5,0
100 μ M	200 mM	5,0
200 μ M	1 mM	5,0
200 μ M	200 mM	5,0
200 μ M	100 mM	5,0
200 μ M	200 mM	4,0
10 μ M	200mM	4,0
10 μ M	1 mM	4,0
200 μ M	200 mM	7,0
10 μ M	200mM	7,0
10 μ M	1 mM	7,0
200 μ M	200 mM	9,0
10 μ M	200mM	9,0
10 μ M	1 mM	9,0

Tabela 1 Diferentes concentrações de fosfato e cloreto de magnésio que foram testadas durante o presente estudo e seus respectivos pHs.

É importante ressaltar que nos experimentos em que o meio N-mínimo foi submetido a mudanças de pH (pHs entre 4,0 e 9,0), o meio LB também teve seu pH alterado para que as diferenças do crescimento bacteriano fossem avaliadas nas mesmas condições de pH.

Os dados obtidos na leitura da D.O. foram então passados para gráficos por onde o comportamento da bactéria às diferentes concentrações e condições foi analisado.

2.5 Análise dos dados

Buscando uma melhor representatividade dos dados calculou-se a média entre os resultados obtidos em cada triplicata. Além disso, visando analisar os dados encontrados de uma forma mais precisa, obteve-se também o desvio padrão entre o resultado de cada triplicata e sua respectiva média. Estes dados então foram passados para gráficos de dispersão com linhas, onde o *eixo x* determina o tempo da leitura e o *eixo y* representa a D.O. medida no tempo correspondente, formando assim a curva de crescimento da *S. Typhimurium* nos diferentes meios de cultura estudados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infecções bacterianas causadas por *Salmonella* não tifoidal são reconhecidas mundialmente como um grave problema de saúde pública, sendo a sorovariedade *S. enterica* Typhimurium ainda um dos principais agentes responsáveis por processos bacterianos diarreio gênicos. Devido a sua grande variedade de reservatórios vertebrados e hospedeiros propriamente ditos, sendo encontrada desde em carnes de animais infectados até mesmo em origem ambiental, e com suas diferentes características patogênicas ela é um dos principais microrganismos alimentares de origem bacteriana que atingem a população humana, além de ser um importantíssimo modelo de patogenicidade em bactérias Gram negativas. Devido a sua exposição a diversas condições ambientais durante o seu ciclo de vida, é acreditável assumir que *S. Typhimurium* passa por diferentes situações de escassez de nutrientes (YURIST-DOUTSCH, 2016 e SILVA, 2016).

No presente estudo buscou-se avaliar a resposta do crescimento microbiano de *S. Typhimurium* em diferentes condições ambientais através de curvas de crescimento medidas em meios LB caldo e N-mínimo, este ultimo também em diferentes concentrações de sais, mimetizando assim algumas das diferentes condições ambientais pelas quais a bactéria é exposta ao longo do seu ciclo infeccioso.

3.1 Curva de crescimento de *S. Typhimurium* em meios LB caldo e N-mínimo

Para obtenção da curva de crescimento da bactéria *S. Typhimurium* foram utilizados inicialmente dois tipos de meio de cultura, o LB caldo, meio conhecido por ser rico em nutrientes necessários para a proliferação de diferentes bactérias e pH ~6,5 considerável ideal para a replicação da maioria das enterobactérias; e o meio N-mínimo, caracterizado principalmente pela baixas concentrações de nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano e com seu pH alterado para 5,0, que é considerado levemente ácido e semelhante à replicação intracelular da maioria dos microrganismos. Após a inoculação nestes meios, *S. Typhimurium* foi cultivada à 37°C com aeração em agitação de 250 rpm por 18h, tendo amostras de 1mL sendo retiradas e medidas via espectrofotômetro à densidade óptica de 600 nm (Fig. 7).

Figura 7 Ensaio de curva de crescimento de *S. Typhimurium* em LB caldo e N-mínimo.

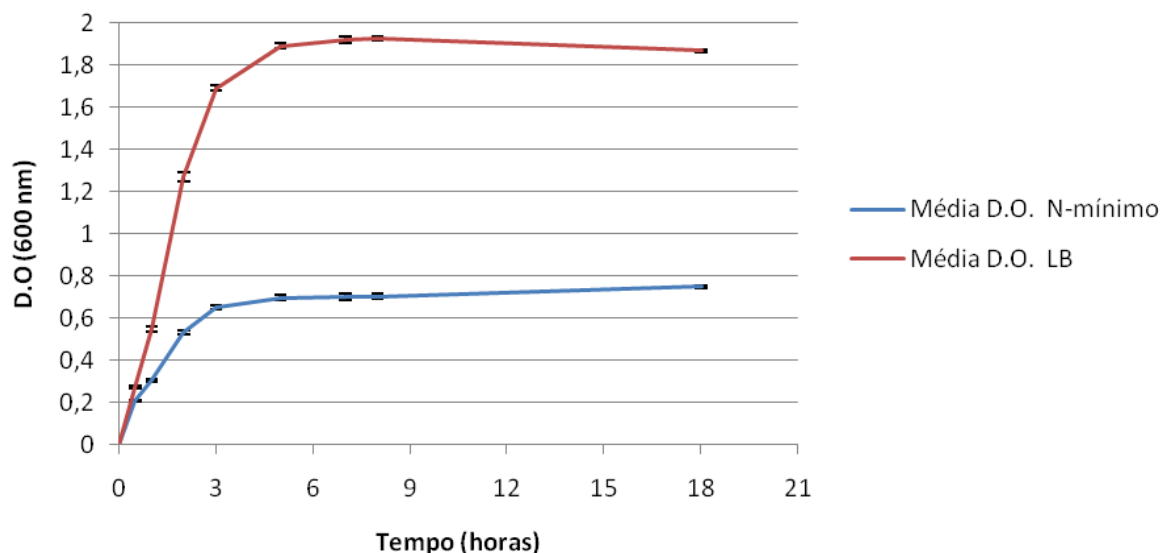


Fig 7. Curva de crescimento de *Salmonella Typhimurium* em meios LB caldo e N-mínimo em pH 5,0. Os pontos de medição foram obtidos a partir do cálculo da média das triplicatas realizadas.

Analisando os resultados, é possível perceber que conforme esperado quando cultivada em LB caldo *S. Typhimurium* teve um crescimento acentuadamente maior do que quando cultivada em N-mínimo, devido a este ser um meio de cultura mais rico em nutrientes. Porém, mesmo sob condições de escassez de nutrientes e pH levemente ácido a bactéria ainda sim foi capaz de crescer e se multiplicar conforme observado (Fig. 7). Baseado nestes dados preliminares aqui ilustrados, podemos observar que assim como observado anteriormente por YURIST-DOUTSCH *et al.* (2016) e FOSTER e HALL (1989), *Salmonella* é um patógeno extremamente eficaz em termos de sobrevivência à condições adversas, sendo capaz de superar a falta de nutrientes e outros mecanismos responsáveis por inibir seu crescimento, como acidez do meio, e mesmo assim sobreviver e crescer em índices ainda elevados.

3.2 Curva de crescimento de *S. Typhimurium* em meio N-mínimo em diferentes concentrações de KH_2SO_4 e MgCl_2

Como foi observado no experimento anterior, *S. Typhimurium* tem a capacidade de sobreviver e se multiplicar em condições inóspitas ao longo do seu ciclo de vida. Como HARAGA *et al* (2008) descreveram previamente, esta capacidade se dá principalmente pela sua habilidade em sentir e perceber o ambiente onde se encontra e desta forma ativar vários mecanismos de virulência que irão possibilitar a sua sobrevivência.

Visando desta forma obter as respostas para este patógeno as prováveis condições as quais ele é exposto durante o seu processo infeccioso e entender um pouco da função dos nutrientes, foram realizadas modificações nas concentrações de dois sais presentes em quantidades escassas em N-mínimo, sendo estes KH_2PO_4 e MgCl_2 . Inicialmente contendo $10\mu\text{M}$ de MgCl_2 e 1mM de KH_2PO_4 o meio N-mínimo teve suas concentrações alteradas entre $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ e $200\mu\text{M}$ de MgCl_2 e 1mM , 100mM e 200mM de KH_2PO_4 , formando assim oito diferentes combinações de concentrações, como mostrado na Tabela 1.

Sendo assim, novas curvas de crescimento de *S. Typhimurium* foram criadas utilizando-se do mesmo método descrito anteriormente, porém com a diferença de que nestas a concentração inicial de KH_2PO_4 (1mM) foi mantida e a concentração de MgCl_2 foi alterada para $100\mu\text{M}$ e $200\mu\text{M}$ (Fig. 8). Em paralelo ao crescimento em N-mínimo e sob as mesmas condições de aeração e temperatura foi feito também cultivo bacteriano em LB caldo buscando demonstrar a diferença de crescimento celular entre as condições presentes no lúmen intestinal e já dentro da célula hospedeira.

Figura 8 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo contendo 1mM de KH_2PO_4 em diferentes concentrações de MgCl_2 empregadas.

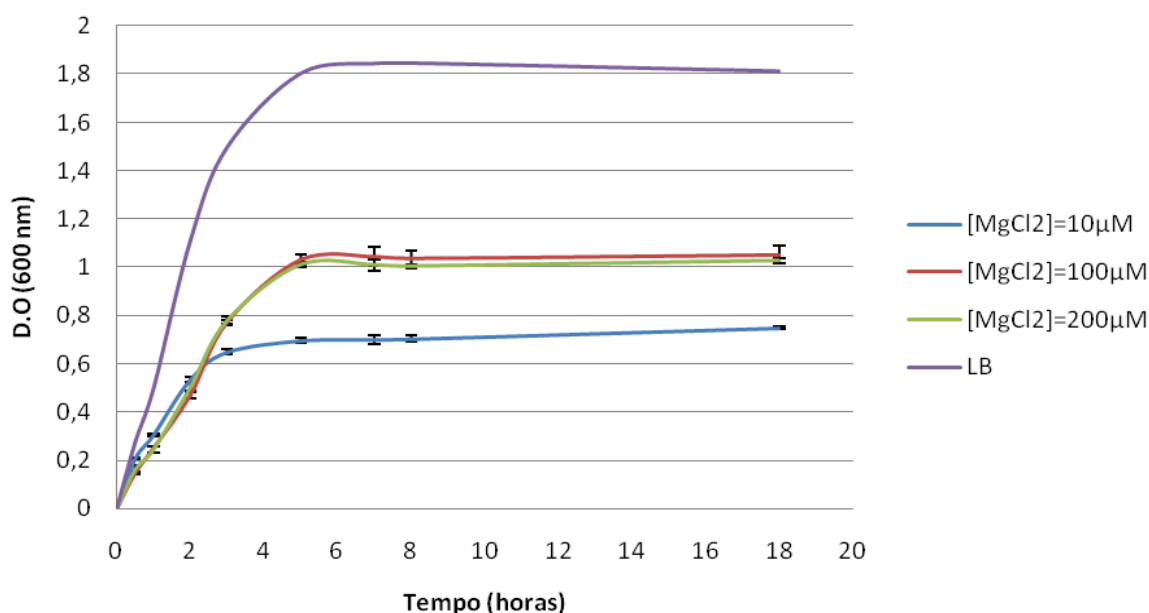


Fig. 8 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo onde a concentração de KH_2PO_4 se mantém inalterada (1mM) enquanto são feitas modificações nas concentrações de MgCl_2 . Crescimento da bactéria em LB caldo foi realizado em paralelo para avaliar as diferenças entre os meios.

É possível notar que com o aumento da quantidade de MgCl_2 a D.O. aumentou, conseqüente o crescimento destes microrganismos, até o ponto em que parece atingir seu ótimo de concentração, não sendo então ultrapassado mesmo tendo sua concentração dobrada. Ou seja, o crescimento celular de *S. Typhimurium* parece ser facilitado de forma controlada a adição de MgCl_2 , respeitando um limite máximo durante seu crescimento.

Baseando-se inicialmente nos dados obtidos na Fig. 8 foram realizadas curvas de crescimento onde as concentrações de fosfato eram mantidas à concentração de 100mM (Fig. 9) e 200mM (Fig. 10) respectivamente, enquanto MgCl_2 teve sua a concentração modificada para 10µM, 100 µM e 200 µM.

Figura 9 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo contendo 100mM de KH_2PO_4 em diferentes concentrações de MgCl_2 .

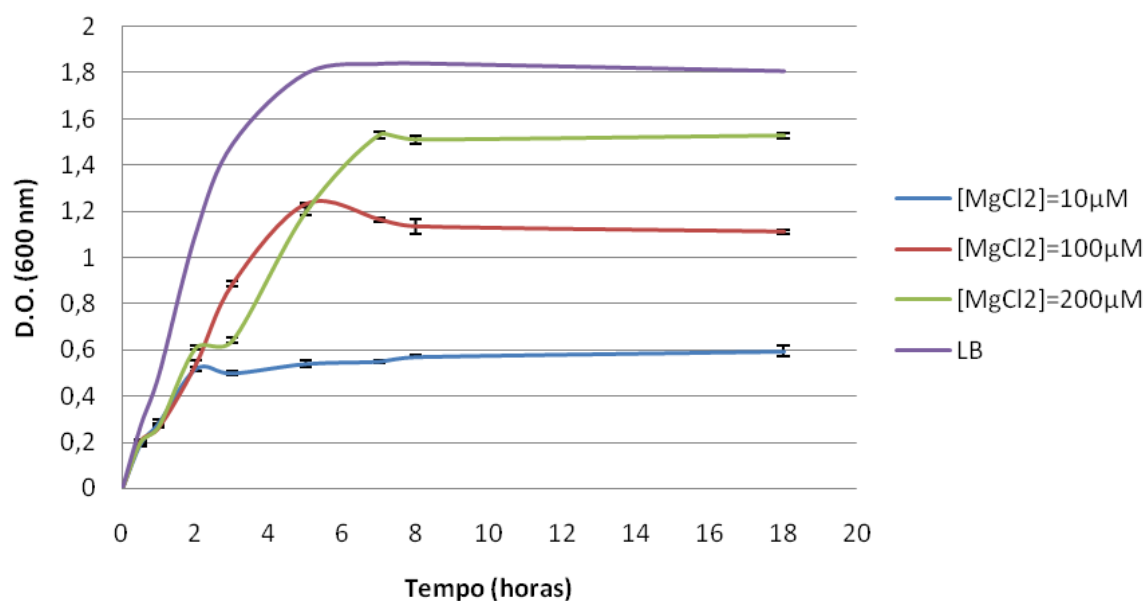


Fig. 9 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo onde a concentração de KH_2PO_4 se mantém em 100mM enquanto são feitas modificações nas concentrações de MgCl_2 . Crescimento da bactéria em LB caldo foi realizado em paralelo para avaliar as diferenças entre os meios.

Figura 10 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo contendo 200mM de KH_2PO_4 em diferentes concentrações de MgCl_2 .

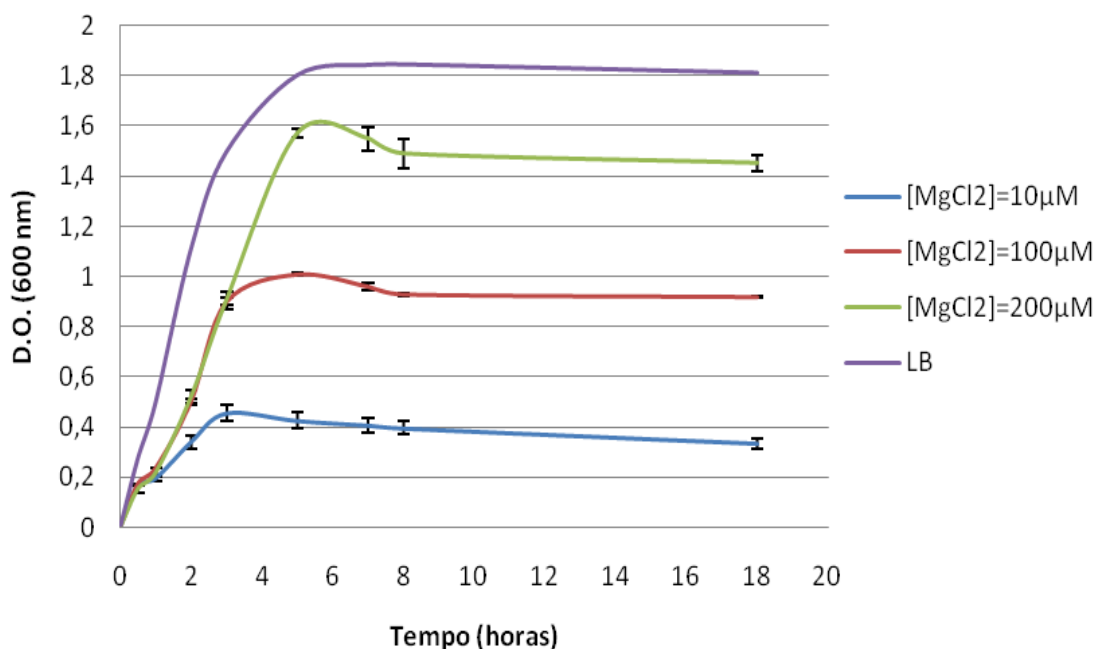


Fig. 10 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo onde a concentração de KH_2PO_4 se mantém em 200mM enquanto são feitas modificações nas concentrações de MgCl_2 . Crescimento bacteriano em caldo LB foi realizado em paralelo para avaliar as diferenças entre os meios.

Com base nos gráficos aqui ilustrados foi possível ressaltar que o MgCl_2 parece de fato ter um papel fundamental para o desenvolvimento e crescimento destes microrganismos em condições de escassez de nutrientes. Em todos os experimentos em que sua concentração aumentou, *S. Typhimurium* pôde se desenvolver melhor, sendo que em alguns casos o seu crescimento chegou a estar em índices muito próximos do crescimento obtido em caldo LB (N-mínimo contendo 200µM de MgCl_2 e com KH_2PO_4 em diferentes concentrações de 100mM e 200mM).

Como foi descrito anteriormente por REINHART (1988), o magnésio é o cátion divalente mais abundante em sistemas biológicos e é essencial para todas as células vivas. Desta forma, este cátion possui diversas funções em sistemas biológicos, como por exemplo, seu envolvimento direto na formação e utilização de ATP, além de ser uma molécula que atua ativando diferentes sistemas de virulência em patógenos como *S. Typhimurium* (GROISMAN *et al.*, 2013).

Devido a sua grande importância no desenvolvimento celular, a função e a regulação do magnésio na célula bacteriana são tópicos extremamente estudados em bactérias Gram negativas, tais como *Escherichia coli* e *S. enterica* Typhimurium. Desta forma, nestes estudos já foram identificadas três diferentes classes de transportadores de Mg^{+2} que tem papel fundamental na regulação deste em bactérias: CorA, que acredita-se ser responsável pelo transporte destes cátions em condições normais de concentração; MgtA e MgtB, que ao contrário de CorA, só medeiam o influxo de Mg^{+2} quando o mesmo está em concentrações limitadas no meio. MgtA e MgtB são encontrados em bactérias e são muito semelhantes as proteínas ATPase do tipo P encontradas em eucariotos, que usam a energia química contida na molécula de ATP para o transporte de cátions através da membrana (MONCRIEF e MAGUIRE, 1998; SUBRAMANI, PERDREAU-DAHL e MORTH, 2016). VESCOVI *et al.*(1996) observaram que em baixas concentrações periplasmáticas de Mg^{+2} , estes microrganismos ativam o sistema de dois componentes PhoQ/P, sistema que constitui uma cascata de transdução de sinais globais em *S. Typhimurium* composto por um sensor quinase ligado a membrana e denominado PhoQ, e seu regulador de resposta citosólica, o PhoP. A ativação do sensor quinase PhoQ presente na membrana leva a fosforilação de PhoP, o que induz a expressão de uma série de genes essenciais para a adaptação da célula microbiana (BADER *et al.*, 2005). Estudos realizados anteriormente comprovam que este sistema de dois componentes regula a expressão de genes em resposta aos níveis de cátions e é ativado em baixas concentrações de cátions divalentes. A expressão de PhoP reprime genes da ilha de patogenicidade SPI1, que são induzidos por altas concentrações de Mg^{+2} encontradas no meio extracelular e ativa genes necessários para a sobrevivência dentro das células fagocíticas, caracterizadas pelas baixas concentrações de Mg^{+2} , no caso proteínas efetoras codificadas na ilha de patogenicidade SPI2 (HANSEN-WESTER e HENSEL, 2001; BADER, 2005).

A partir dos dados encontrados no presente estudo e na literatura podemos confirmar que magnésio é um nutriente essencial para o desenvolvimento do patógeno, e em maiores concentrações este incentiva a melhora na replicação intracelular. Além disso, por ter diferentes sistemas que regulam a presença do magnésio dentro da célula, sendo grande parte deles dependentes de fosforilação, é

possível criar a hipótese de que o crescimento bacteriano é facilitado quando há de fato maiores concentrações de fosfato, uma vez que este é um componente essencial e indispensável para a formação de ATP, tornando-o também em elemento fundamental para a regulação intracelular do magnésio.

Uma vez avaliada a reação da *S. Typhimurium* as diferentes concentrações de magnésio, buscou-se então verificar a reação da bactéria as diferentes concentrações de outro componente essencial para o seu desenvolvimento: o fósforo. Nutriente muito importante, o fósforo é fornecido na forma de sais de fosfato e é indispensável para a formação das moléculas de ácidos nucleicos, os ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), responsáveis pela transmissão das características genéticas, sendo indispensável durante a multiplicação celular. Ademais, uma importante função dos grupos fosfatos é sua atuação na síntese dos compostos orgânicos de alta energia - adenosina trifosfato (ATP), sendo fundamental para a formação de estoques e transferência de energia na célula. Esses mesmos grupos fosfato também são capazes de ativar e desativar enzimas celulares que catalizam diversas reações químicas na célula além de atuarem na formação de moléculas denominadas como fosfolípidios, componentes que constituem as membranas celulares (DEIWICK *et al.* 1999, NOGUEIRA e MIGUEL, 2009; YURIST-DOUTSHC, 2016).

Como já foi descrito anteriormente por DEIWICK *et al.* (1999) SPI2 é fortemente ativada por escassez de fosfato e magnésio, uma vez que esta condição mimetiza o meio intracelular onde a expressão de SPI2 é essencial para a sobrevivência de *S. Typhimurium*. Para analisar o efeito da escassez de fosfato ao longo do crescimento bacteriano *S. Typhimurium* foi cultivada em meio N-mínimo em condições de concentrações saturadas e limitadas de fosfato e em varias concentrações de magnésio. A metodologia utilizada para realização destas curvas de crescimento não foi alterada, mantendo assim as mesmas condições externas de cultivo utilizadas ao longo do presente estudo, alterando-se apenas as quantidades de sais utilizadas. A Fig. 11 mostra os resultados obtidos a partir do cultivo de *S. Typhimurium* em N-mínimo em quantidades crescente de KH_2PO_4 , porém com concentração de magnésio inalterada. As figuras subsequentes, logo Fig. 12 e Fig. 13, representam os valores obtidos durante o cultivo de *S. Typhimurium* em maiores

concentrações de MgCl_2 e demonstram como esta bactéria reage tanto a elevados níveis de fosfato no meio quanto a falta do mesmo.

Figura 11 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo contendo $10\mu\text{M}$ de MgCl_2 em diferentes concentrações de KH_2PO_4

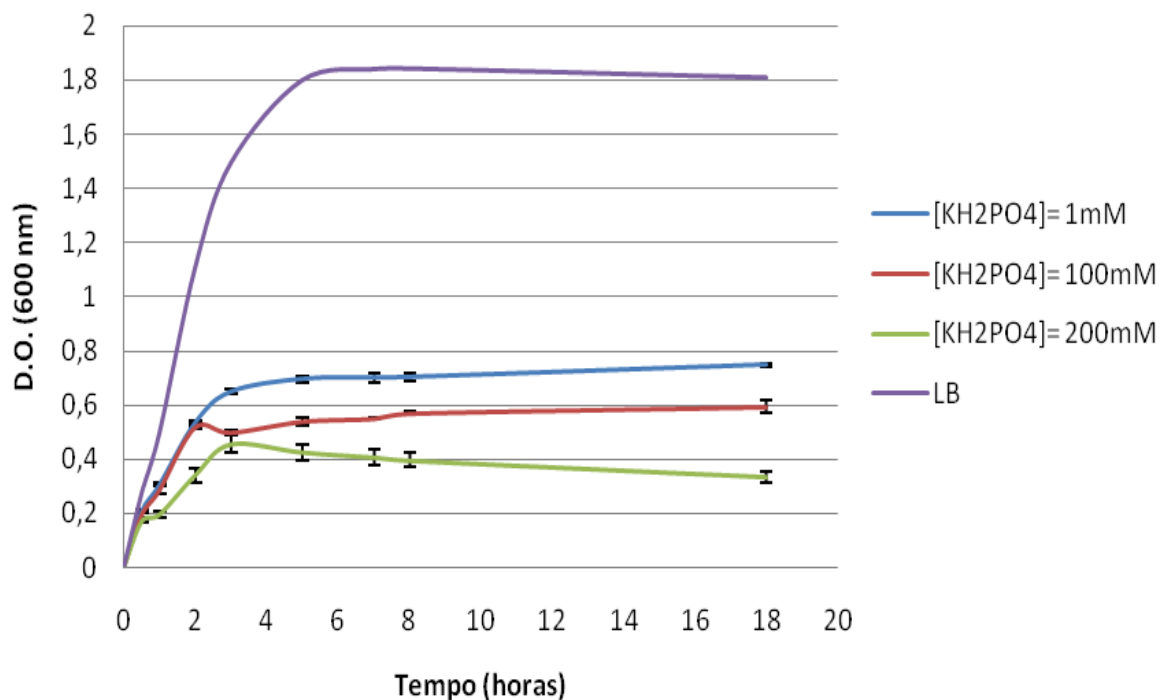


Fig. 11 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo onde a concentração de MgCl_2 se mantém inalterada ($10\mu\text{M}$) enquanto são feitas modificações nas concentrações de KH_2PO_4 . Crescimento da bactéria em LB caldo foi realizado em paralelo para avaliar as diferenças entre os meios.

Figura 12 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo contendo 100 μ M de MgCl₂ em diferentes concentrações de KH₂PO₄

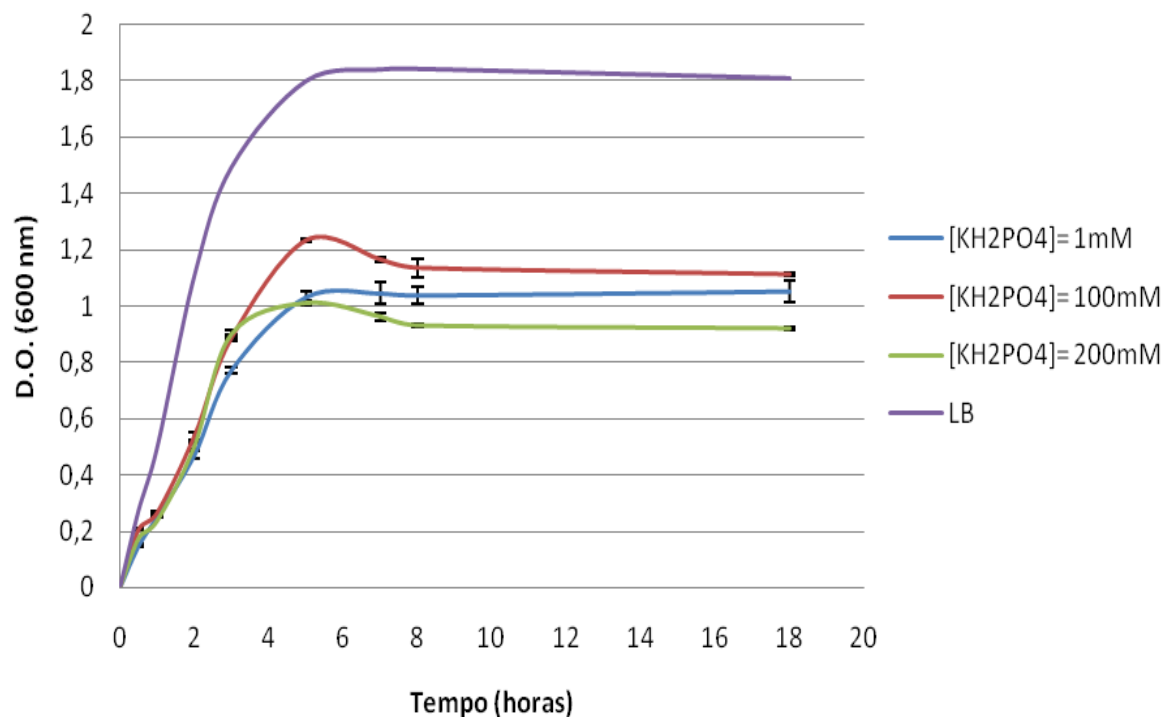


Fig. 12 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo onde a concentração de MgCl₂ se mantém inalterada (100 μ M) enquanto são feitas modificações nas concentrações de KH₂PO₄. Crescimento da bactéria em LB caldo foi realizado em paralelo para avaliar as diferenças entre os meios.

Figura 13 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo contendo 200 μ M de MgCl₂ em diferentes concentrações de KH₂PO₄.

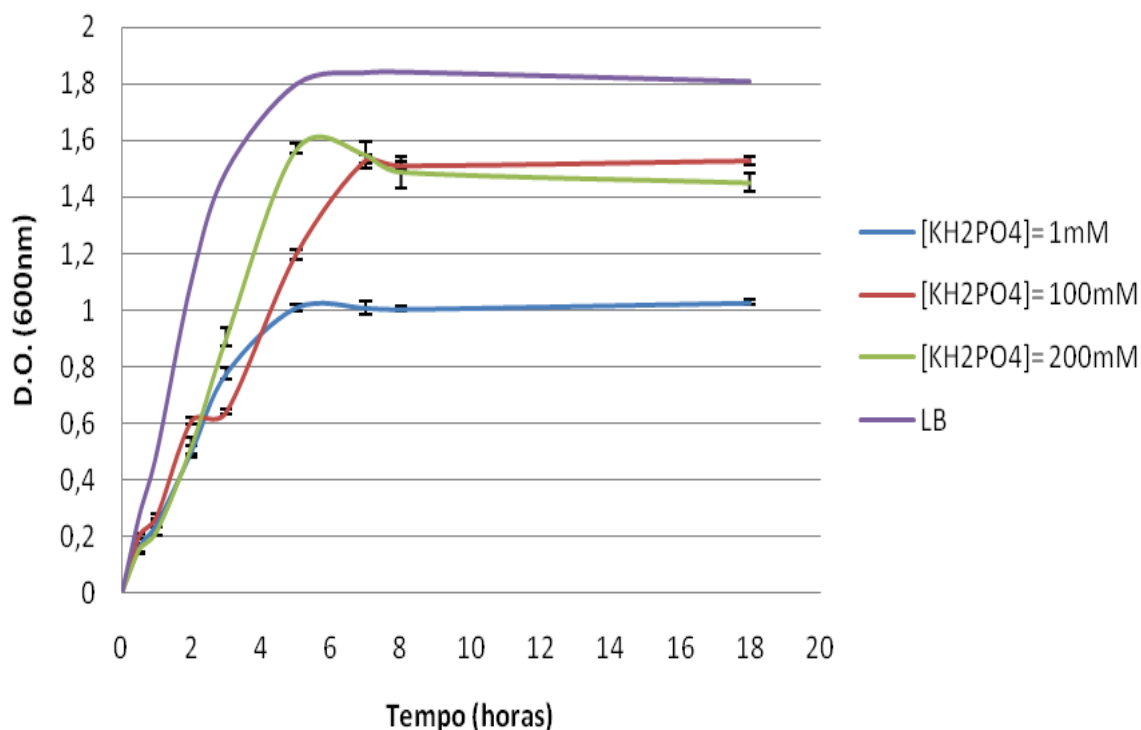


Fig. 13 Curva de crescimento bacteriano de *S. Typhimurium* em N-mínimo onde a concentração de MgCl₂ se mantém inalterada (200 μ M) enquanto são feitas modificações nas concentrações de KH₂PO₄. Crescimento da bactéria em LB caldo foi realizado em paralelo para avaliar as diferenças entre os meios.

Comparando os gráficos, é possível notar que, assim como relatado em estudos anteriores, *S. Typhimurium* tem diferentes características quando cultivada em condições de stress (DEIWICK *et al.*, 1999). É interessante ressaltar que, quando as concentração de MgCl₂ e KH₂PO₄ se mantêm baixas (Fig.11) *S. Typhimurium* se multiplica muito menos, se comparada ao crescimento alcançado em LB. Ademais, o aumento das concentrações de KH₂PO₄ não parece agir melhorando nem induzindo seu crescimento, mas sim inibindo ainda mais sua proliferação. Resultados semelhantes foram evidenciados por DIAS e PACHECO (1954), onde a adição de diferentes concentrações de fosfato ao meio levaram a célula bacteriana a lise. Estas mortes celulares podem ser atribuídas a capacidade bacteriolítica de alguns fosfatos, capacidade esta que varia de acordo com o sal de fosfato utilizado.

Comparando o que foi observado na Fig.11 com os dados obtidos nas Figs. 12 e 13, pode-se dizer que o aumento nas concentrações de $MgCl_2$ age de alguma forma no metabolismo celular de *S. Typhimurium* permitindo um maior crescimento de *S. Typhimurium* em condições que anteriormente se mostraram inóspitas (elevadas concentrações de fosfato). Além disso, quando comparados os níveis de crescimentos atingidos nas diferentes situações, observa-se que nas condições onde magnésio se encontra em abundância no meio e *S. Typhimurium* consegue atingir maiores níveis de crescimento, aproximando-se do crescimento alcançado em caldo LB.

3.3 Curva de crescimento de *S. Typhimurium* em meio N-mínimo em diferentes concentrações de KH_2SO_4 e $MgCl_2$ em diferentes pHs.

De fato *S. Typhimurium* é uma bactéria resistente que pode sobreviver longos períodos tanto em ambientes secos quanto em úmidos, podendo ser encontrada em alimentos, águas naturais, em carne de animais contaminados e em humanos infectados. Em todas estas situações, a bactéria pode estar propícia a mudanças extremas de acidez no meio. Devido a poluição das águas naturais, estes organismos podem passar por situações onde ocorre uma extrema acidificação do meio, ou até situações que levam a neutralização deste. Ao longo do seu processo infeccioso no ser humano, a *S. Typhimurium* deve ultrapassar o pH ácido do estômago para que possa chegar as células epiteliais do intestino onde então encontrará novas barreiras para poder se propagar, como sua internalização pelo fagossomo da célula epitelial e sua passagem pelo fagolisossomo de macrófagos do hospedeiro, ambos caracterizados por seu pH ácido e inóspito para microrganismos. Para que conseguisse sobreviver a todas estas barreiras encontradas ao longo do seu ciclo de vida *S. Typhimurium* precisou desenvolver novos mecanismos de defesas (NOJOUMI, SMITH e ROWBURY, 1995; FOSTER, 2001).

Já foi comprovado na literatura que *S. Typhimurium* pode sobreviver dentro do fagolisossomo de macrófagos, onde o vacúolo passa por mudanças metabólicas ao longo de sua maturação, como a formação de H_2O_2 , superóxido, e outros fatores antimicrobianos, além de abaixar seu pH interno para 4,0 e 3,0 que sozinho já possui um alto poder bactericida (HALL e FOSTER, 1989). Esta habilidade pode ser

explicada em partes pela existência de um sistema denominado ATR (Acid Tolerance Response) que é ativado em espécies de *Salmonella* em pHs em torno de 6,0 e 5,0 e é capaz de proteger o patógeno em pHs mais ácidos, onde apenas a homeostase ácido-base não é suficiente.

Com o objetivo de avaliar como *S. Typhimurium* se comporta em condições de diferentes pHs e também como diferentes sais influenciam o crescimento bacteriano nestas condições foram feitas novas curvas de crescimento em três condições de concentração salina diferentes e em quatro condições distintas de pHs pelo mesmo método apresentado anteriormente (Tabela 1) (Fig.14).

Figura 14 Curva de crescimento de *S. Typhimurium* cultivada em meio N-mínimo com diferentes concentrações de KH_2PO_4 e MgCl_2 e em diferentes pHs.

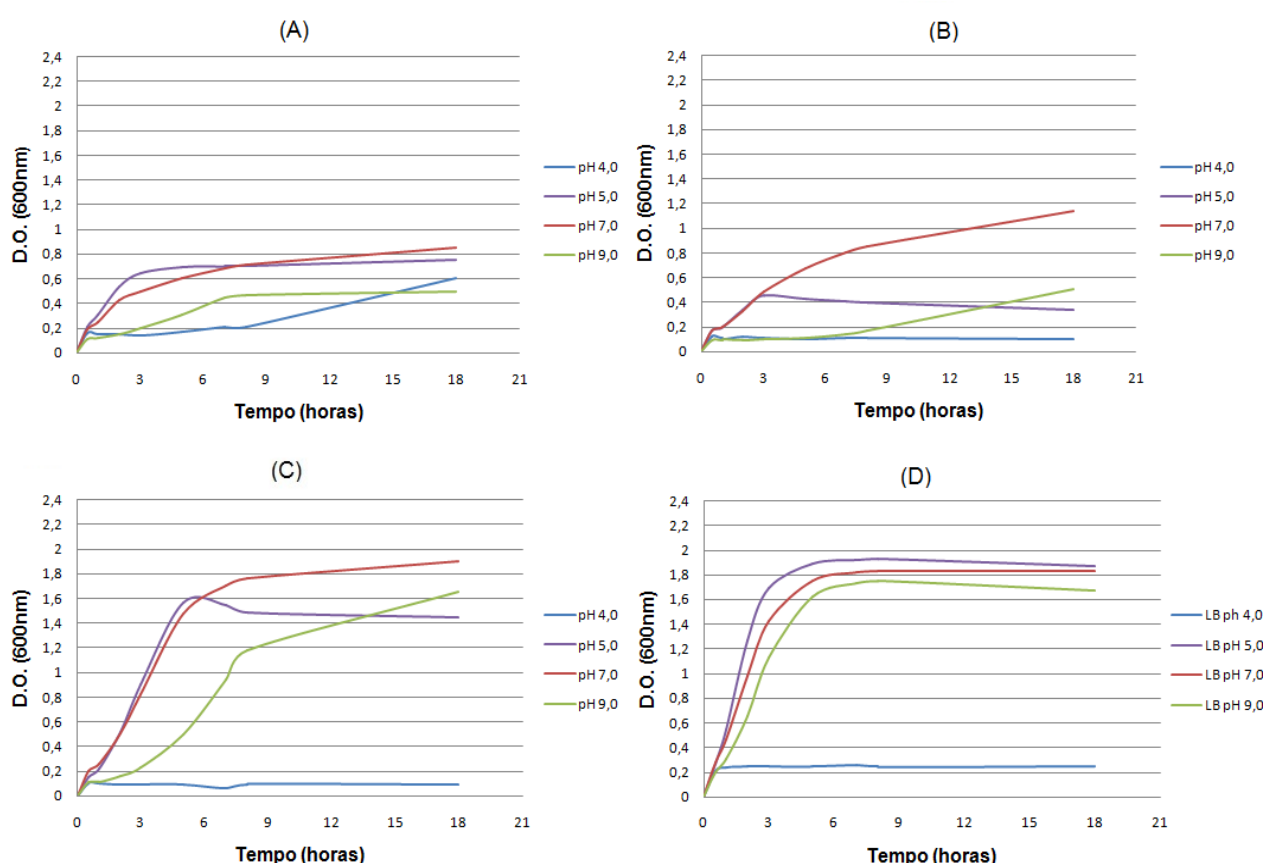


Fig. 14 Curvas de crescimento de *S. Typhimurium* em meios contendo diferentes concentrações de KH_2PO_4 e MgCl_2 e em diferentes pHs: (A) crescimento em N-mínimo sem alterações de concentração; (B) crescimento em N-mínimo com 10μM de MgCl_2 e 200mM de KH_2PO_4 ; (C) crescimento em N-mínimo com 200μM de MgCl_2 e 200mM de KH_2PO_4 ; (D) crescimento bacteriano em meio LB em diferentes pHs.

A Fig. 14 D. mostra que, na presença de nutrientes em abundância (meio caldo LB) *S. Typhimurium* se multiplicou muito bem em pHs neutros e básicos (7,0 e 9,0) e mesmo em pH acidificado (5,0). Entretanto, quando exposta à níveis maiores de acidez seu desenvolvimento foi extensivamente comprometido, limitando-se a valores baixíssimos.

Quando exposto a meios com diferentes condições ambientais o patógeno se comporta de forma semelhante, uma vez que seu desenvolvimento em pH 4,0 segue sempre sendo o mais baixo. Além disso, também podemos ressaltar que em todas as situações os melhores níveis de crescimento ocorreram em pHs intermediários (5,0 e 7,0), ou seja, pHs que não são extremamente básicos, como 9,0, ou ácidos a, por exemplo, pH 4,0. Logo, ao contrário do que se esperava, *S. Typhimurium* se mostrou incapaz de sobreviver em meios ácidos como os encontrados dentro de macrófagos, por exemplo. Isto pode ser explicado pelos estudos realizados por FOSTER e HALL (1991) onde foi demonstrado que, para sobreviver a pHs ácidos o patógeno precisa passar por um processo adaptativo, ou seja, por um processo no qual a acidificação do meio ocorre aos poucos, tendo um decréscimo gradual. Resultados semelhantes também foram registrados por NOJOURI, SMITH e ROWBURY (1995) em estudos onde foram feitos experimentos com *Salmonella spp* que tiveram o pH do meio alterado gradualmente e que foram cultivadas diretamente em pHs ácidos - a adaptação gradual ao meio ácido se mostrou importante para o desenvolvimento do patógeno. Logo, podemos dizer que a etapa de acidificação do meio como um todo é importante para a sobrevivência da *S. Typhimurium* ao longo do seu ciclo infeccioso.

Além disso, também podemos observar na Fig. 14 que o aumento de $MgCl_2$ parece gerar bons resultados no desenvolvimento destas bactérias, uma vez que as maiores densidades ópticas aqui mensuradas foram nas condições onde este sal estava em abundância. Podemos atribuir esta resposta ao fato da bomba H^+ -ATPase, ou bomba de prótons, ser dependente de Mg^{+2} (FOSTER e HALL, 1991). Esta bomba localiza-se na membrana plasmática da bactéria e atua bombeando H^+ do citoplasma da célula para o seu exterior. Logo, uma vez ativada na presença de Mg^{+2} ela retira estes prótons do interior da célula, tornando o seu pH interno menos ácido, e assim permitindo sua sobrevivência .

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo possibilitam concluir que:

- *S. Typhimurium* de fato é capaz de sobreviver e se multiplicar em meio pobre em nutrientes e com pH ácido, além de resistir às diferentes concentrações ambientais. Isto indica que ela é um patógeno intracelular facultativo capaz de se adaptar às diferentes situações encontradas ao longo do seu processo infeccioso, o que novamente demonstra seu potencial como um patógeno bacteriano humano de alta periculosidade e causador de surtos epidêmicos de alta prevalência.
- Mesmo sendo capaz de sobreviver em concentrações escassas de magnésio, a presença deste parece desenvolver um papel fundamental na adaptação da bactéria ao meio, facilitando de alguma forma seu crescimento;
- A ação do fosfato sobre o crescimento celular de *S. Typhimurium* parece estar diretamente correlacionada com a presença de magnésio no meio, uma vez que na ausência deste, o fosfato age de forma a inibir a multiplicação do patógeno, enquanto que na presença de ambos (fosfato e magnésio) a bactéria é capaz de se multiplicar muito bem, alcançando valores muito semelhantes aos obtidos em meio rico em nutrientes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSLER, Bonnie L.; SURETTE, Michael G.. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 12, p.7046-7050, jun. 1998.

DEIWICK, Jorg et al. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 6, p.1759-1773, abr. 1999.

ELLERMEIER, Jeremy R.; SLAUCH, James M. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Current Opinion In Microbiology**, v. 10, n. 1, p.24-29, fev. 2007.

FERREIRA, Flavia Brylynskyi. **Salmonelose**. 2005. 83 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2005.

FLINT, Annika; STINTZI, Alain; BUTCHER, James. Stress Responses, Adaptation, and Virulence of Bacterial Pathogens During Host Gastrointestinal Colonization. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p.387-411, abr. 2016.

FOSTER, John W.; HALL, Holly K.. Adaptive Acidification Tolerance Response Of *Salmonella Typhimurium*. **Journal Of Bacteriology**, v.172, n. 2, p. 771-778. fev. 1990.

GAHAN, Cormac G.m; HILL, Colin. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p.93-100, set. 1999.

HANSEN-WESTER, Imke; HENSEL, Michael. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Elsevier**, v. 03, n. 7, p. 549-559. jun. 2001.

HARAGA, Andrea; OHLSON, Maikke B.; MILLER, Samuel I.. Salmonellae interplay with host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p.53-66, jan. 2008.

HUGHES, D. T. et al. Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 107, n. 21, p.9831-9836, 10 maio 2010.

HUGHES, David T.; SPERANDIO, Vanessa. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p.111-120, fev. 2008.

MONCRIEF, Mary Beth C.; MAGUIRE, Michael E.. Magnesium and the role of *mgtC* in Growth of *Salmonella typhimurium*. **Infection And Immunity**, v. 66, n. 8, p.3802-3809, jun. 1998.

MOREIRA, Cristiano G. et al. Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 110, n. 4, p.1470-1475, jan. 2013.

NARIYA, Maulik K. et al. Mathematical Model for Length Control by the Timing of Substrate Switching in the Type III Secretion System. **Plos Computational Biology**, v. 12, n. 4, p.1-14, abr. 2016.

NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha; MIGUEL, Lucieny de Faria Souza. Bacteriologia. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Epsjv, 2009. Cap. 3. p. 221-397

PACHECO, Genesio e DIAS, Vinicius Moreira. Ação bacteriolítica dos fosfatos (Fosfatólise bacteriana). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1954, vol.52, n.2, pp.405-414.

POIRIER V, AV-GAY Y. Intracellular Growth of Bacterial Pathogens: The Role of Secreted Effector Proteins in the Control of Phagocytosed Microorganisms.

Microbiol Spectrum, v. 03, n. 6 , dez. 2015 . VMBF-0003-2014.
doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0003-2014. dez, 2015.

REINHART, Richard A.. Magnesium Metabolism. **Archives Of Internal Medicine**, v. 148, n. 11, p.2415-2420, nov. 1988. American Medical Association (AMA).

ROBINSON, T. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 44, n. 1-2, p.83-92, out. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00120-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00120-2).

SRIDHAR, Sushmita; STEELE-MORTIMER, Olivia. Inherent Variability of Growth Media Impacts the Ability of *Salmonella Typhimurium* to Interact with Host Cells. **Plos One**, v. 11, n. 6, p.1-14, jun. 2016.

SUBRAMANI, Saranya; PERDREAU-DAHL, Harmonie; MORTH, Jens Preben. The magnesium transporter A is activated by cardiolipin and is highly sensitive to free magnesium in vitro. **Elife**, v. 5, p.1-17, jan. 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An introduction**. 10th edition. Glenview: Pearson, 2012.

WHO. *Salmonella* (non-typhoidal), Fact sheet nº 139.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>, 2013

YURIST-DOUTSCH, Sophie et al. Nutrient Deprivation Affects *Salmonella* Invasion and Its Interaction with the Gastrointestinal Microbiota. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 01-14. jul. 2016.

ZHOU, Daoguo et al. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 2, p.248-260, jan. 2001.

Araraquara, 05 de Janeiro de 2017.

Aluna: Karla Gaban Pereira Rodrigues

De acordo,

Orientador: Profº. Dr. Cristiano Gallina Moreira