

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 26/03/2023.



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.

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, esteve 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 <i>Typhimurium</i> via QseEF e QseBC.....	17
Figura 3: Organização dos operons de <i>visP/ygiV</i> e <i>qseBC</i>	18
Figura 4: Modelo de <i>VisP</i> de <i>S. Typhimurium</i>	19
Figura 5: Mecanismo da regulação transcricional de <i>AraC</i>	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: Esquemática 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; ROGGENTIN; 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).

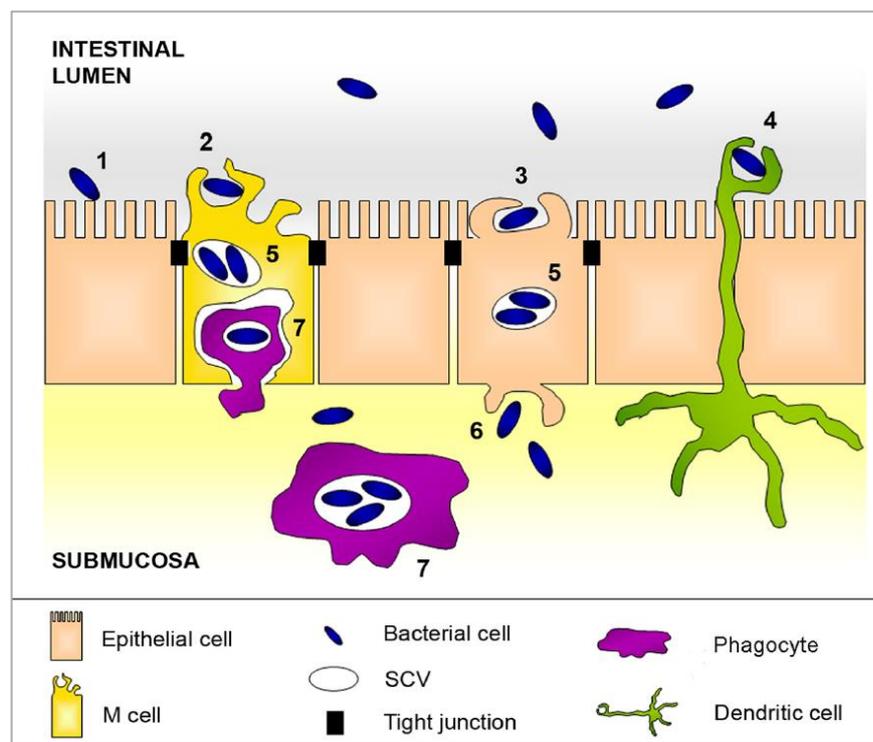
As espécies de *Salmonella* estão entre as que mais causam doenças de origem alimentar no mundo e uma das principais causas bacterianas de gastroenterite, que podem ser casos leves ou moderados e não necessita de tratamento, ou casos severos, que geralmente acometem pacientes imunocomprometidos, crianças 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

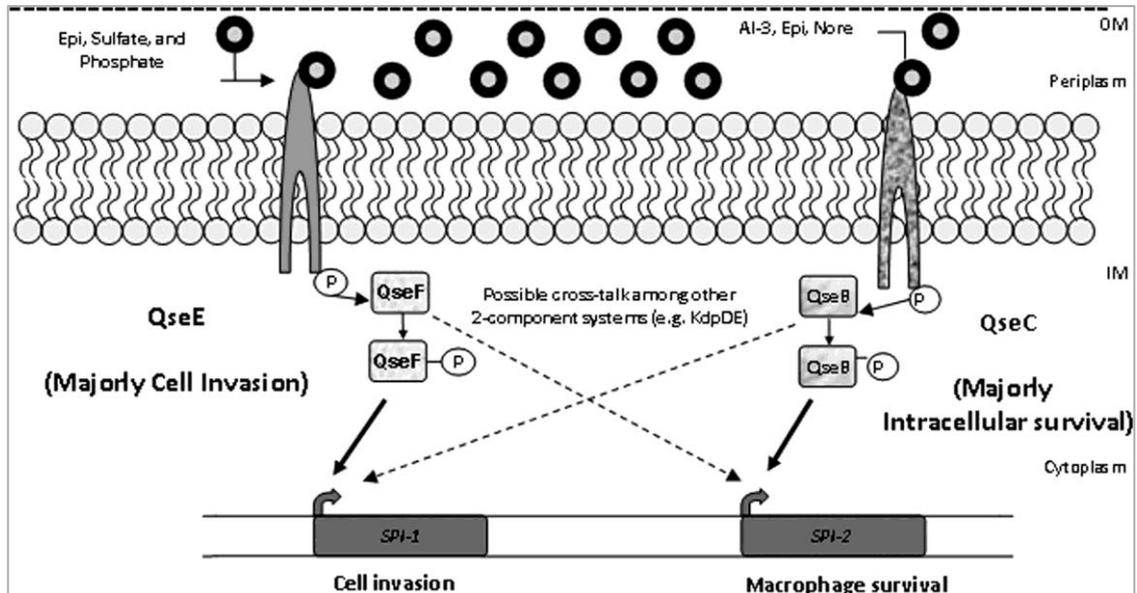
As células do hospedeiro e do patógeno possuem mecanismos de comunicação, tanto intra e interespecífica ou até inter e intra-Reinos (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). Esses mecanismos estão relacionados a sinalizações químicas detectadas por sistemas que atuam como sensores do meio externo 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).

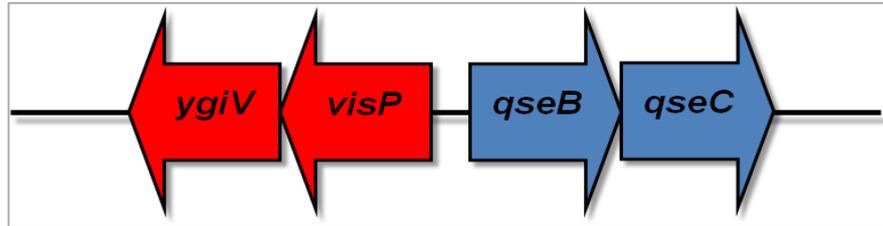
1.4 Operon *visP/ygiV*

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*.

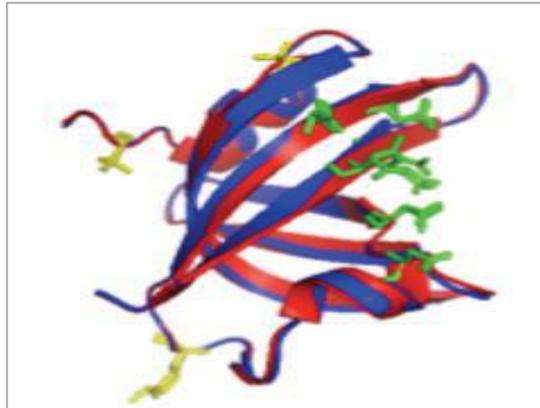


Em *S. Typhimurium*, o gene *visP* apresenta-se *upstream* ao gene *ygiV*, que codifica um regulador de transcrição da família AraC, ambos são transcritos em um mesmo operon e localizados no mesmo regulon de QseBC. **Fonte:** MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.* (2013).

VisP foi classificada *in silico* como uma proteína da família BOF (Oligonucleotide/oligosacáride 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*.

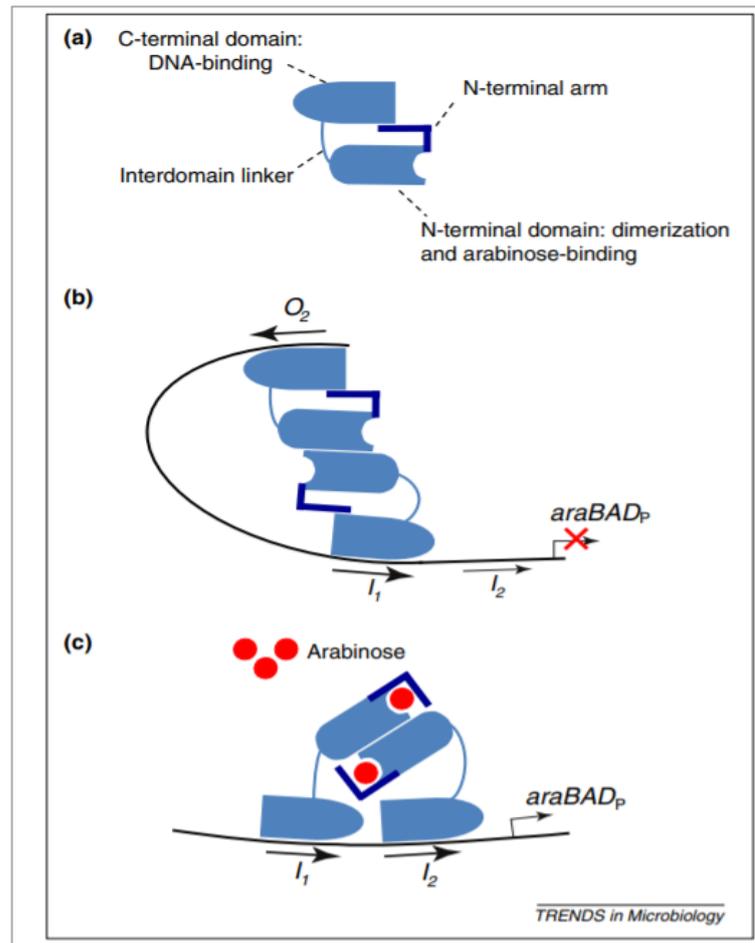


Representação *in silico* de VisP, classificada como uma proteína da família BOF (Oligonucleotide/oligosacáride Binding Fold). **Fonte:** MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.* (2013).

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 transcricional 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).

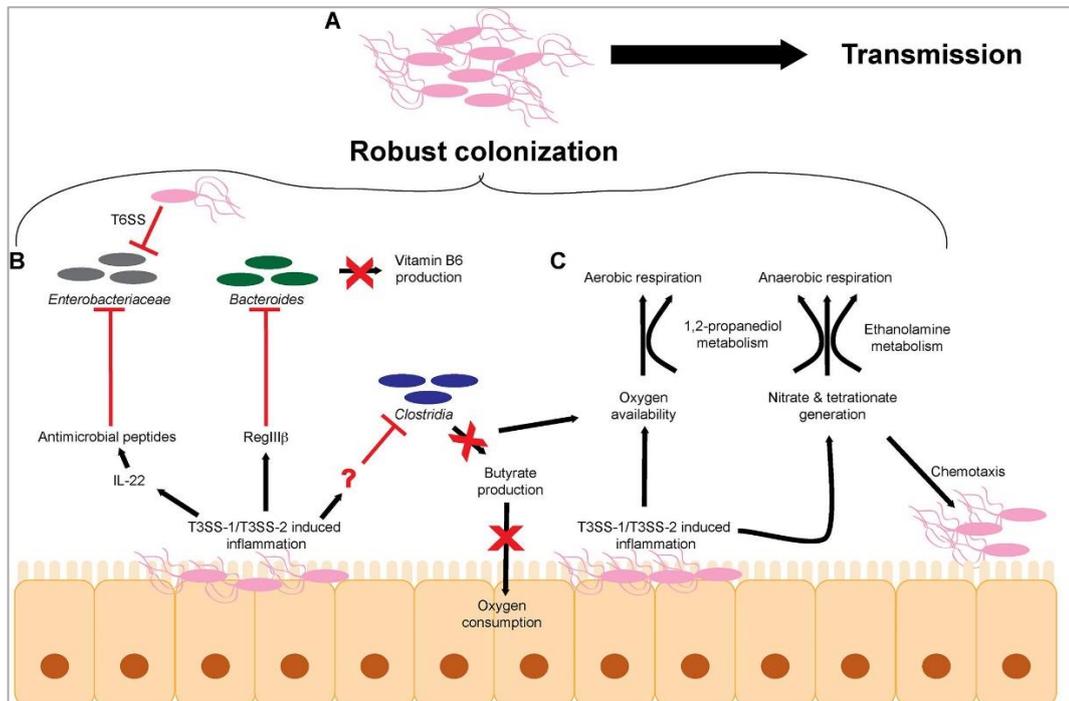
A microbiota do trato gastrointestinal, além de fornecer nutrientes e vitaminas, pode afetar o metabolismo, o sistema digestivo e outros sistemas do hospedeiro

(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).

Figura 6: Colonização de *S. Typhimurium* frente à resistência mediada pela microbiota intestinal.



(A) Os efeitos cumulativos da inflamação induzida por T3SS-1 e T3SS-2 levam a colonização robusta do intestino. **(B)** *S. Typhimurium* utiliza o T3SS-1 e T3SS-2 para gerar resposta imune do hospedeiro no intestino, eliminando membros da microbiota. **(C)** A inflamação induzida pelos efetores secretados por T3SS-1 / T3SS-2 leva à produção de metabólitos, como aceptores de elétrons, incluindo oxigênio, nitrato e tetrionato, que promovem a respiração aeróbia e anaeróbia. T3SS, sistema de secreção tipo III; T6SS, sistema de secreção tipo VI. **Fonte:** ANDERSON; KENDALL (2017).

Devido à alta densidade e diversidade da microbiota do trato gastrointestinal é essencial que ocorra algum tipo de comunicação para coordenação dos processos entre essa comunidade e o hospedeiro. Essa coordenação ocorre através de uma variedade de produtos que variam de moléculas de sinalização a metabólitos (MARCOBAL; SOUTHWICK; EARLE; SONNENBURG, 2013). Essa sinalização é explorada por patógenos entéricos para reconhecerem o ambiente, podendo assim ativar seus mecanismos de virulência e ajustar seu metabolismo para garantir uma competição bem-sucedida por nutrientes e um nicho de colonização (CLARKE; HUGHES; ZHU; BOEDEKER *et al.*, 2006).

1.5.1 Fontes de carbono e energia

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; MCDUGALL *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 tetrionato 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).

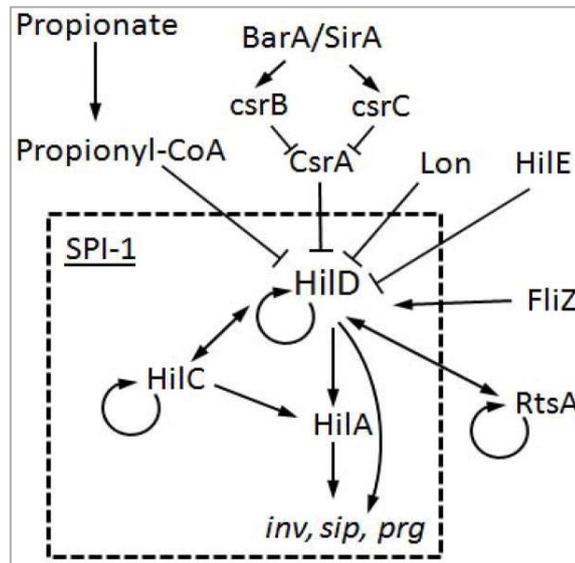
1.5.2 Ácidos graxos de cadeia curta e utilização de 1,2 propanodiol

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.

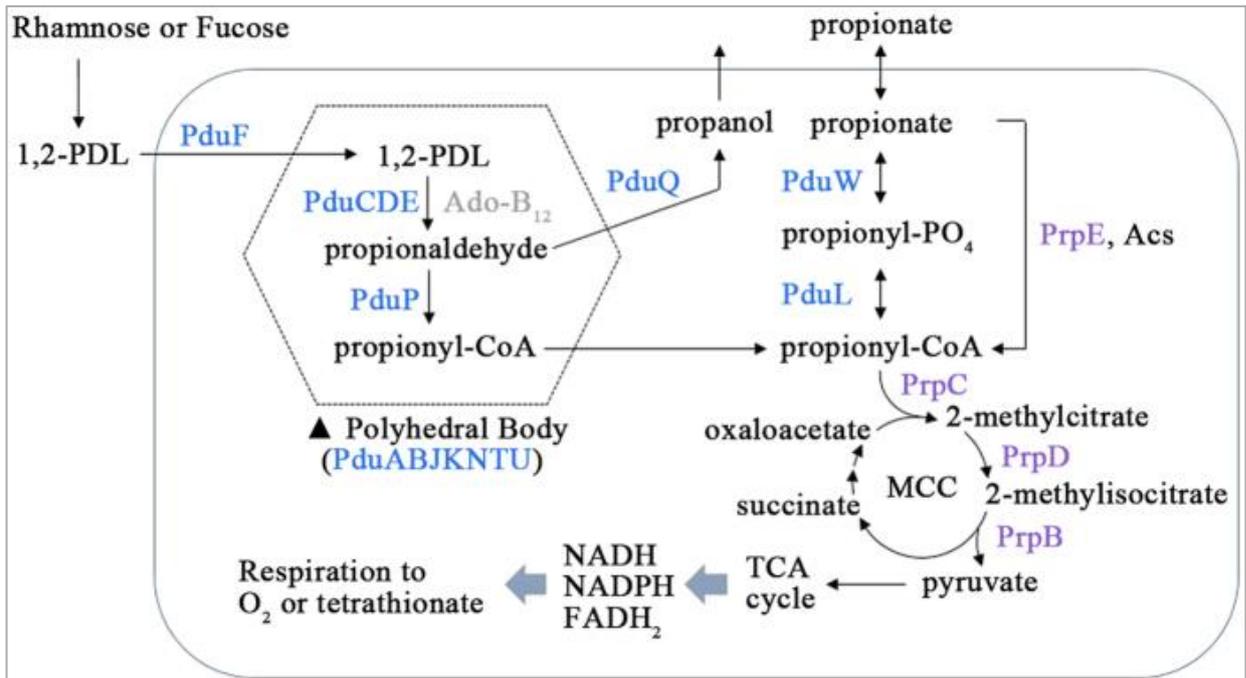


As setas indicam controle positivo, enquanto as barras em forma de T indicam controle negativo.

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).

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. Serovar 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 HilD. **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-POLYMERIS, 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.