



UNIVERSIDADE

ESTADUAL

PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia

PATRICK DA SILVA

**Participação de VisP e LpxO na definição das formas de
antígeno-O e na patogênese de *Salmonella enterica* sorovar
Typhimurium**

Araraquara - SP

2016

PATRICK DA SILVA

**Participação de VisP e LpxO na definição das formas de
antígeno-O e na patogênese de *Salmonella enterica* sorovar
Typhimurium**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof.º Dr. Cristiano Gallina Moreira

Araraquara - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586p

Silva, Patrick da

Participação de VisP e LpxO na definição das formas de antígeno-O e na patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium / Patrick da Silva. – Araraquara, 2016.
xvi, 71 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 Microbiologia.

Orientador: Cristiano Gallina Moreira.

1. Patogenicidade. 2. LPS. 3. Sinalização química. 4. Gram-negativa. 5. Enteropatógenos.
6. Virulência. I. Moreira, Cristiano Gallina, orient. II. Título.

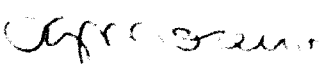
CAPES: 50700005



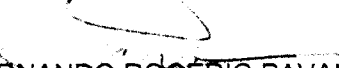
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PATRICK DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aos 19 dias do mês de julho do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA - Orientador(a) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Prof. Dr. CLOVIS WESLEY OLIVEIRA DE SOUZA do(a) Departamento de Morfologia e Patologia / Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de PATRICK DA SILVA, intitulada **VisP e LpxO participam na definição das formas de antígeno-O e na patogênese de Salmonella enterica sorovar Typhimurium**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: _____

_____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA


Prof. Dr. CLOVIS WESLEY OLIVEIRA DE SOUZA


Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN

*Dedico este trabalho aos meus pais, os quais sempre deram liberdade em
minhas decisões e apoio incondicional no caminho que tenho trilhado.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Cristiano Gallina Moreira, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelos conselhos e direcionamentos para realização deste trabalho.

Aos professores Vanessa Sperandio e M. Stephen Trent, pela oportunidade de colaboração.

À FCFar – UNESP, FAPESP (processo nº 2014/06779-2), e CNPq pelo apoio institucional e financeiro para a realização deste trabalho.

***“... com o clarão do raio da silibrina
desintegro o poder da bactéria.”***

(Bienal - Zeca Baleiro)

RESUMO

Sinalização química em bactérias patogênicas é um mecanismo empregado para interagir com o hospedeiro e sua respectiva microbiota. Através desta interação ocorre a regulação dos mecanismos de virulência. Estudando o mecanismo de sinalização química do sistema de 2-componentes QseBC em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium foi aberta uma nova perspectiva para desvendar os mecanismos de patogenicidade. Dentre estes, uma nova proteína VisP (**Virulence and stress-related Periplasmic protein**) foi reportada. Seu papel inicial na interação com a enzima LpxO em *S. Typhimurium* foi anteriormente demonstrada. O antígeno-O da camada de LPS fornece proteção contra as defesas do hospedeiro e, particularmente, o comprimento de sua cadeia exerce um papel essencial. A montagem do antígeno-O possui o sistema Wzz, o qual determina o comprimento final de sua cadeia polissacarídica, e também apresenta uma distribuição tri-modal. Forma cadeias curtas (S-OAg), longas (L-OAg) e muito longas (VL-OAg) de antígeno-O. As proteínas WZZ_{ST} e WZZ_{lepE} regulam, respectivamente, a síntese das cadeias L-OAg e VL-OAg. Neste estudo, os genes *wzz_{ST}*, *wzz_{lepE}*, *visP* e *lpxO* foram mutados, via mutagenese λ Red, obtendo simples e duplos mutantes. Dados preliminares evidenciaram que há um aumento nas cadeias VL-OAg e L-OAg no mutante $\Delta visP$, e reciprocamente há diminuição de L-OAg em $\Delta lpxO$. Foram feitos ensaios para avaliar a motilidade, invasão em células epiteliais e sobrevivência intracelular em macrófagos com as amostras obtidas pelos ensaios de mutagenese. Foi evidenciado uma redução de 1,2 e 1,0 ordem de magnitude nos processos de invasão e sobrevivência intracelular, respectivamente, no mutante $\Delta visP$ em relação à amostra selvagem, conforme já descrito, e também uma redução de 70,61% na motilidade comparada com à amostra selvagem. Observou-se que a deleção dos genes *wzz_{lepE}* e *lpxO* no mutante $\Delta visP$ faz com que a bactéria retorne ao fenótipo da amostra selvagem nos processos de motilidade, invasão em células epiteliais e sobrevivência intracelular em macrófagos. Este efeito de complementação fenotípica

não ocorre no mutante duplo Δwzz_{ST} , apresentando os mesmos níveis do mutante simples $\Delta visP$, apesar deste possuir um aumento na expressão de genes envolvidos na motilidade e invasão celular comparado com o mutante $\Delta visP$. Aparentemente, há a atenuação destes processos patogênicos em bactérias com um alto nível de VL-OAg, levando-nos a hipotetizar que este tipo de cadeia de antígeno-O possui relevância na patogênese de *S. Typhimurium*. Wzz_{fepE} e LpxO apresentaram uma evidente participação nos processos de motilidade, invasão celular e sobrevivência intracelular via VisP, e possivelmente o antígeno-O de comprimento muito longo (VL-Oag) apresenta um papel de inibição nestes processos, além disso, evidenciou-se que VisP desempenha uma função relevante na montagem das cadeias de antígeno-O e na patogênese de *S. Typhimurium*.

PALAVRAS-CHAVE: Patogenicidade. LPS. Sinalização química. Gram-negativa. Virulência. Enteropatógenos.

ABSTRACT

Chemical signaling is a mechanism employed by several bacterial species to interact within surrounding microbiota and their host. Upon this interaction the pathogenic bacteria regulate their virulence traits. The two-component system QseBC was described on chemical signaling in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and a novel branch of pathogenic cascade regulation was revealed. Among these mechanisms a novel protein was described, VisP (**Vir**ulence and **s**tress related **P**eriplasmic protein). VisP interacts with LpxO enzyme on the periplasm. The O-antigen of the LPS layer provides protection against host defenses, and particularly its chain's length plays an essential role. The O-antigen assembly has the Wzz system, which determines the O-antigen final chain length, and also presents a tri-modal distribution. It forms short (S-OAg), long (L-OAg) and very-long (VL-OAg) O-antigen chains. The Wzz_{ST} and Wzz_{lepE} proteins respectively regulate the L-OAg and VL-OAg synthesis.

In this study, *wzz_{ST}*, *wzz_{lepE}*, *visP* and *lpxO* genes were mutated via λ Red mutagenesis, obtaining single and double-mutants. Our preliminary data have shown that VisP increases VL-OAg and L-OAg, conversely LpxO diminishes L-OAg chain length. The motility, epithelial cell invasion and macrophage intracellular survival and replication were assessed with the mutants obtained. The $\Delta visP$ presented 1,2 and 1,0 order of magnitude reduction in cell invasion and intracellular macrophage replication, respectively, comparing with WT *S. Typhimurium*, as described, and 70,61% less motility rate than WT. Mutating *wzz_{lepE}* or *lpxO* genes in $\Delta visP$ recovers the motility, epithelial cell invasion and macrophage intracellular survival and replication WT phenotypes. Nonetheless, this effect does not occur with *wzz_{ST}* gene deletion in $\Delta visP$, as this double-mutant presents the same phenotypes of $\Delta visP$ single-mutant, although this deletion raises expression rates of motility and cell invasion related genes significantly. Apparently, these pathogenic processes are attenuated within samples with VL-Oag high levels, taking us to hypothesize that there is a correlation between this O-

antigen chain length and *S. Typhimurium* pathogenesis. Wzz_{tepE} and LpxO presented an important role on motility, epithelial cells invasion and macrophage intracellular survival through VisP, and probably the VL-OAg inhibits these processes. Furthermore, VisP plays a relevant function on O-antigen chain assembly and pathogenesis of *S. Typhimurium*.

KEYWORDS: Pathogenicity. LPS. Chemical signaling. Gram-negative. Virulence. Enteropathogens.

Lista de figuras

Figura 1 Organização dos operons <i>qseBC</i> e <i>ygiVW</i> em <i>S. Typhimurium</i>	5
Figura 2 Esquema da reação catalisada por LpxO.....	6
Figura 3 Cromatografia em camada fina de Lipídio-A marcado com ³² P.....	7
Figura 4 Modelo de VisP de <i>S. Typhimurium</i>	7
Figura 5 Esquema ilustrativo da membrana de bactérias Gram-negativas e do LPS....	9
Figura 6 Modalidade do comprimento da cadeia de antígeno-O de <i>S. Typhimurium</i> ...	10
Figura 7 Esquema representativo da regulação da montagem e estrutura do LPS de <i>S. Typhimurium</i>	11
Figura 8 Esquema representativo da macroestrutura proteica flagelar de <i>S. Typhimurium</i>	12
Figura 9 Esquema representativo da regulação transcricional dos constituintes do flagelo.....	13
Figura 10 Análise do comprimento final das cadeias de antígeno-O do LPS de <i>S. Typhimurium</i> por PAGE.....	14
Figura 11 Modelo do papel da distribuição tri-modal dos diferentes comprimentos de antígeno-O na virulência de <i>S. Typhimurium</i>	15
Figura 12 Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas no ensaio de <i>Swimming</i>	25
Figura 13 Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas, evidenciando o efeito da superexpressão de WZZ _{fepE} na motilidade <i>Swimming</i>	27
Figura 14 Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas no ensaio de <i>Swarming</i>	28
Figura 15 Análise quantitativa da invasão de <i>S. Typhimurium</i> em células epiteliais HeLa.....	30
Figura 16 Análise quantitativa da sobrevivência intracelular de <i>S. Typhimurium</i> em macrófagos J774.....	31
Figura 17 Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de <i>S. Typhimurium</i> de genes envolvidos na motilidade.....	33
Figura 18 Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de <i>S. Typhimurium</i> de genes envolvidos no processo patogênico de invasão celular mediada por SPI-1.....	34

Figura 19 Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de <i>S. Typhimurium</i> dos genes <i>basS</i> e <i>mgtB</i>	35
Figura 20 Esquema mostrando como as formas muito longas do antígeno-O poderiam impedir a rotação do flagelo através do atrito eletroestático.....	38
Figura 21 Esquema mostrando como as formas muito longas do antígeno-O poderiam impedir o TTSS de atingir a membrana da célula epitelial.....	41

Lista de tabelas e quadros

Quadro 1 Cepas bacterianas utilizadas neste estudo.....18

Tabela 1 Interações entre fenótipos envolvidos na patogenicidade e o comprimento da cadeia de antígeno-O em *S. Typhimurium*.....42

Lista de abreviaturas

1-PP.....	1-disfosfato
³² P.....	Radioisótopo ³² Fosfato
AI-3.....	Autoindutor-3
BOF.....	<i>Binding Oligosaccharide/nucleotide Folding</i>
CAMP.....	<i>Cationic antimicrobial peptide</i>
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA.....	ácido etileno diamino tetra-acético
EHEC.....	<i>Enterohaemorrhagic Escherichia coli</i>
EPEC.....	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
Epi.....	Epinefrina
Grupos –OH.....	Grupo Hidroxila
HBB.....	<i>Hook Basal Body</i>
L-Ara4N.....	L-aminoarabinose
LB.....	Meio Luria-Bertani
LEE.....	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
L-Oag.....	<i>Long O-antigen</i>
LPS.....	Lipopolissacarídeo
MOI.....	<i>Multiplicity of Infection</i>
NaOH.....	hidróxido de sódio
NE.....	Norepinefrina
OAg.....	<i>O-antigen</i>
PAGE.....	<i>Polyacrilamide Gel Electroforesis</i>
PAMPs.....	<i>Pathogen associated molecular patherns</i>
PASQUIBAC.....	Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química em Bactérias

PBS.....	<i>Phosphate buffered saline</i>
pEtn.....	fosfoetanolamina
P.G.....	Peptidoglicano
qRT-PCR.....	<i>quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
QseBC.....	Sistema de dois componentes de <i>Escherichia coli</i>
SCV.....	<i>Salmonella containing vacuole</i>
SDS.....	dodecil sulfato de sódio
S-Oag.....	<i>Short O-antigen</i>
SPI-1.....	<i>Salmonella Pathogenicity Island 1</i>
SPI-2.....	<i>Salmonella Pathogenicity Island 2</i>
S. Typhimurium.....	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium
TTSS.....	<i>Type Three Secretion System</i>
UFC.....	Unidades Formadoras de Colônia
UPEC.....	<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>
VL-Oag.....	<i>Very-Long O-antigen</i>
WT.....	<i>Wild-type</i>
x g.....	unidade de força centrífuga
$\Delta\Delta CT$	<i>Comparative Critical Threshold</i>

Sumário

Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Lista de ilustrações.....	ix
Lista de tabelas e quadros.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Sumário.....	xiv
CAPÍTULO 1.....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Sinalização química via Autoindutor-3/Epinefrina/noraepinefrina.....	2
1.2. Patogenicidade em <i>Salmonella</i>	3
1.3. VisP e LpxO.....	5
1.4. Regulação de montagem do antígeno-O via Wzz _(fepE) e Wzz _(ST)	8
1.5. Motilidade e patogenicidade em <i>Salmonella</i>	11
1.6. Hipótese de estudo.....	14
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivos gerais.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Cultivo e armazenamento de bactérias.....	17
3.2. Complementação gênica.....	18
3.2.1. Extração plasmidial.....	19
3.2.2. Preparo de bactérias para transformação genética.....	20
3.2.3. Transformação genética por eletroporação.....	20
3.3. Ensaio de motilidade (<i>Swimming</i> e <i>swarming</i>).....	21
3.4. Cultivo de célula epitelial e macrófago.....	21
3.5. Ensaio de invasão de células HeLa.....	21
3.6. Ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos.....	22
3.7. Análise estatística.....	22
3.8. Extração de RNA.....	23
3.9. Análise de expressão gênica por qRT-PCR.....	23
4. Resultados.....	24
4.1. Novas construções moleculares.....	24
4.2. Ensaios de motilidade (<i>Swimming</i> e <i>swarming</i>).....	24
4.3. Ensaios fenotípicos em células epiteliais e macrófagos.....	29
4.4. Análise de expressão gênica.....	32
4.5. Discussão.....	35

5. Conclusões.....	43
Referências.....	44
CAPÍTULO 2.....	51

CAPÍTULO 1

1. Introdução

Salmonelose é uma das mais comuns e amplamente distribuídas doenças de origem alimentar e é causada pela bactéria *Salmonella*. É estimado em torno de dez milhões de casos em humanos no mundo a cada ano, e resulta em mais de 100 mil mortes. Para as espécies de *Salmonella*, mais de 2500 diferentes cepas (sorotipos ou sorovares) foram identificadas até então. *Salmonella* é uma bactéria ubíqua e pode sobreviver várias semanas em ambiente seco e vários meses na água. A maioria dos sorotipos podem infectar um amplo espectro de espécies diferentes. Geralmente, causam gastroenterite, o que pode não causar complicações e não necessitar tratamento, entretanto, em jovens, idosos e pacientes imunocomprometidos pode ser severa. A salmonelose é transmitida por ingestão de alimentos de origem animal infectados, e é caracterizada por febre aguda, dor abdominal, diarreia, náusea e vômito. Entre os sorotipos não-tifoidais mais importantes, estão *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (WHO, 2013).

Sinalização química em bactérias é um dos mais intrigantes aspectos da relação patógeno-hospedeiro com a microbiota (HUGHES *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2010; MOREIRA; SPERANDIO, 2012), mecanismo através do qual as mesmas interagem com o hospedeiro e também com a sua respectiva microbiota. Devido à complexidade destes sinais em um ambiente de composição diversa e flutuante como o intestino humano, sua completa elucidação demanda novos estudos. Esses sinais, bem como suas interações, são de suma importância na Microbiologia. A sinalização química em bactérias é essencial tanto nas interações intraespecíficas, assim como nas interespecíficas, como na interação direta com células eucarióticas, ou seja, na relação patógeno-hospedeiro (UNAL *et al.*, 2012).

A sinalização química via hormônios adrenérgicos de estresse, como epinefrina (Epi) e noraepinefrina (NE), possui papel fundamental na virulência de bactérias conforme previamente reportado (SPERANDIO *et al.*, 2003). Estes sinais em conjunto com uma molécula provinda da microbiota, o Autoindutor-3 (AI-3), são reconhecidos por um sensor histidina quinase da membrana de bactérias patogênicas, como *S. Typhimurium*, nomeado de QseC, e este sensor fosforila o seu regulador cognato, QseB, o qual irá ativar uma cascata de regulação, resultando na expressão de fatores de virulência. Este sistema composto do sensor QseC e do regulador QseB é caracterizado como sistema de 2-componentes QseBC (SPERANDIO *et al.*, 2003).

Bactérias empregam diversos mecanismos para se comunicar com o meio e regular seus mecanismos de sobrevivência. Com objetivo de caracterizar novos fatores de virulência associados à sinalização química da célula bacteriana, recentemente nosso grupo caracterizou uma nova proteína do espaço periplasmático de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (MOREIRA *et al.*, 2013). Esta proteína foi identificada a partir de estudos em *S. Typhimurium* como sistema previamente caracterizado de 2-componentes QseBC e a sinalização via Epi/NE/AI-3 (SPERANDIO *et al.*, 2002; MOREIRA; SPERANDIO, 2012). Inicialmente denominada YgiW, esta proteína foi renomeada para VisP (**V**irulence and **s**tress-related **P**eriplasmic protein) devido a sua função (MOREIRA *et al.*, 2013), a qual pertence a família BOF (binding oligosaccharide/nucleotide folding) (GINALSKI *et al.*, 2004), que possui a característica predita de se ligar a açúcares e demais moléculas de baixo peso molecular e apresenta potencial de virulência (GINALSKI *et al.*, 2004).

Em estudos preliminares, demonstrou-se seu papel inicial na interação com a enzima LpxO (Dioxigenase Fe²⁺/α-cetoglutarato-dependente) durante modificações de Lipídio A, especificamente na adição de grupos –OH, e também na interação com a cadeia de peptidoglicano em *S. Typhimurium* (MOREIRA *et al.*, 2013). A completa elucidação deste mecanismo em relação à patogenicidade dos sistemas de secreção do tipo III, codificados pelas ilhas de patogenicidade SPI-1 e SPI-2, bem como a participação do antígeno-O do LPS de *S. Typhimurium* é um tópico muito importante na compreensão da relação patógeno-hospedeiro.

1.1. Sinalização química via Autoindutor-3/Epinefrina/noraepinefrina

Procaríotos e eucariotos empregam sinalização celular por meio de sinais químicos. Essa sinalização permeia a comunicação interespecífica e intraespecífica, além da comunicação inter e intra-Reinos (SPERANDIO *et al.*, 2003). A sinalização química através dos hormônios Epi e NE, do hospedeiro, e do Autoindutor-3 (AI-3), da microbiota, foi inicialmente descrita na ativação de genes de virulência em *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (SPERANDIO *et al.*, 2003). Este mecanismo está presente também em diversas espécies bacterianas, bem como em seus respectivos hospedeiros (SPERANDIO *et al.*, 2003). O sistema de 2-componentes QseBC foi previamente reportado como sendo responsável na virulência de EHEC (CLARKE *et al.*, 2006), EPEC (SIRCILI *et al.*, 2004), UPEC (HADJIFRANGISKOU *et al.*, 2011), *S. Typhimurium* (PATEL; GALÁN, 2006; BEARSON E BEARSON, 2008; RASKO *et al.*, 2008;

MOREIRA *et al.*, 2010) além de outros sorovares (PULLINGER *et al.*, 2010), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (JUÁREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013), *Haemophilus influenzae* (UNAL *et al.*, 2012), *Aeromonas hydrophila* (KHAJANCHI *et al.*, 2012), *Edwardsiella tarda* (WANG *et al.*, 2011), *Francisella tularensis* (MOKRIEVICH *et al.*, 2010), entre outros.

Além do sistema de QseBC, outro sistema de 2-componentes abaixo na cascata de regulação, porém ainda sob a regulação de Epi, foi também descrito anteriormente. Trata-se do sistema de 2-componentes QseEF em EHEC (READING *et al.*, 2007) e *S. Typhimurium* (MOREIRA; SPERANDIO, 2012), cabendo ainda salientar a comunicação cruzada entre estes sistemas de 2-componentes (MOREIRA; SPERANDIO, 2012; NJORGE; SPERANDIO, 2012). O sensor quinase QseE reconhece além de Epi, variações nos níveis de íons de sulfato e fosfato do ambiente. Assim, QseE fosforila seu regulador de resposta cognato QseF (READING *et al.*, 2007), o que consequentemente regula as ilhas de patogenicidade LEE em EHEC (NJORGE; SPERANDIO, 2012) e SPI-1 no caso de *S. Typhimurium* (MOREIRA; SPERANDIO, 2012) e desta forma medeia a virulência nestes organismos. Estes são alguns dos sinais químicos já elucidados na literatura, mas muitos outros ainda necessitam ser esclarecidos, principalmente levando-se em consideração a riqueza de nutrientes, compostos e microbiota da qual fazem parte dentro do aparato gastrointestinal humano e todas as inter e intra-relações específicas com a microbiota residente.

1.2. Patogenicidade em *Salmonella*

A patogênese no gênero *Salmonella*, ou mais especificamente em *S. Typhimurium*, é um mecanismo complexo e orquestrado. Diversas ilhas de patogenicidade são descritas na literatura e foram melhor elucidadas com o sequenciamento das linhagens LT2 (MCCLELLAND *et al.*, 2001) e SL1344 (KROGER *et al.*, 2012), mas classicamente algumas destas ilhas são diretamente ligadas aos processos infecciosos de *S. Typhimurium*, como a *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) ligada a invasão celular (GALÁN; CURTISS, 1989), e *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) vinculada à sobrevivência intracelular, sobrevivência em macrófagos e infecção sistêmica em camundongos (OCHMAN *et al.*, 1996; CIRILLO *et al.*, 1998; HENSEL *et al.*, 1998). As ilhas SPI-1 e SPI-2 codificam distintos Sistemas de Secreção do Tipo 3 (*Type Three Secretion System* – TTSS), estruturas em forma de agulha molecular responsáveis por injetar as proteínas efetoras essenciais durante estes dois momentos distintos, extra e

intracelular, do processo infeccioso (GALÁN; CURTISS, 1989; GROISMAN; OCHMAN, 1993; GALÁN, 1996; OCHMAN *et al.*, 1996; SHEA *et al.*, 1996).

O *locus* SPI-1 contém tanto genes que codificam para proteínas efetoras, como reguladores do SPI1-TTSS. Entre estes três efetores SopE, SopE2 e SopB, no lado do patógeno e outros três como as Rho GTPases: Cdc42, Rac1 e RhoG, no lado do hospedeiro, são requeridos para a coordenação e eficiência do processo de invasão. Juntas estas proteínas lideram a reorganização dos filamentos de actina no processo de internalização por macropinocitose. SopB, juntamente com os demais efetores supracitados, coordena a secreção do cloreto via desfosforilação lipídica (ZHOU *et al.*, 2001), e indiretamente estimula Cdc42 e RhoG através de sua atividade fosfoinositídeo fosfatase (HARDT *et al.*, 1998; FRIEBEL *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2001; PATEL; GALÁN, 2006). SopB também promove a doença intestinal por aumentar os níveis intracelulares de D-myo-inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate, que estimula secreção de cloreto celular (ZHOU *et al.*, 2001). Outro efector secretado via TTSS de SPI-1, SipA, embora não seja exigido para a invasão celular, auxilia o início da polimerização no ponto específico de invasão de *S. Typhimurium*, devido ao fato de diminuir a concentração crítica e aumentar a estabilidade dos filamentos de actina neste ponto específico da célula hospedeira (ZHOU *et al.*, 1999; MCGHIE *et al.*, 2001; HIGASHIDE *et al.*, 2002). O operon *inv-spa* contido em SPI-1 codifica fatores responsáveis pela formação do TTSS, e o seu primeiro gene, *invF*, codifica um ativador transcricional da família AraC requisitado na expressão de efetores de SPI-1 (DARWIN; MILLER, 1999).

Apesar de ser codificada fora de SPI-2, a proteína efetora SifA é secretada via o aparato TTSS codificado via SPI-2, sendo este crucial na indução da tubulação do fagossomo de *S. Typhimurium*. SifA liga-se a proteína SKIP, uma proteína quinase ligante encontrada em mamíferos. SifA quando coexpressa com SseJ induz a tubulação dos endossomos no hospedeiro mamífero, indicando que este mimetiza ou ativa GTPases da família RhoA (OHLSON *et al.*, 2008). Sendo desta forma essencial para o processo infeccioso de *S. Typhimurium*.

O operon *mgtCBR* codifica as proteínas MgtC, importante fator de virulência na sobrevivência intracelular em macrófagos e crescimento em baixas concentrações de Mg^{2+} , a ATPase MgtB, transportadora de Mg^{2+} , e o peptídeo de membrana MgtR, que medeia a degradação de MgtC (SNAVELY *ET AL.*, 1991; BLANC-POTARD; GROISMAN, 1997; ALIX; BLANC-POTARD, 2008). Este operon é regulado transcricionalmente pelo sistema de dois

componentes PhoP/PhoQ, o qual ativa seu sensor quinase, PhoQ, através de estímulos externos como baixa concentração de Mg^{2+} , pH ácido e peptídeos antimicrobianos (GARCIA VESCOVI *et al.*, 1996; SONCINI *et al.*, 1996; BADER *et al.*, 2005; PROST *et al.*, 2007).

1.3. VisP e LpxO

Previamente caracterizou-se a importância do sensor quinase QseC na patogênese e sinalização química *in vivo* em *S. Typhimurium* (MOREIRA *et al.*, 2010). A partir deste estudo, identificou-se a proteína periplasmática VisP, que associa mecanismos distintos como resposta a estresse bacteriano, sobrevivência e virulência, possuindo alta importância ao que se refere a manutenção de membrana bacteriana (MOREIRA *et al.*, 2013).

Anteriormente na literatura, VisP foi apenas mencionada rapidamente em um estudo proteômico de larga escala em *Escherichia coli* como uma proteína periplasmática Sec-B dependente (BAARS *et al.*, 2006) e brevemente relacionada a resposta de estresse bacteriano em uma amostra de meio-ambiente (LEE *et al.*, 2010). Em *S. Typhimurium* esta proteína foi apontada por responder diferentemente a agentes antimicrobianos, tal qual Polimixina B (MERIGHI *et al.*, 2009; PILONIETA *et al.*, 2009), importante peptídeo catiônico antimicrobiano (CAMP) na virulência de *S. Typhimurium*.

Apresentando uma organização interessante em um operon adjacente e de direção oposta ao operon de *qseBC*, porém antes (*upstream*), ambos genes *ygiW* (renomeado como *visP*) e *ygiV* possuíam uma função completamente indefinida em estudos prévios (Figura 1).

Figura 1 - Organização dos operons *qseBC* e *ygiVW* em *S. Typhimurium*.

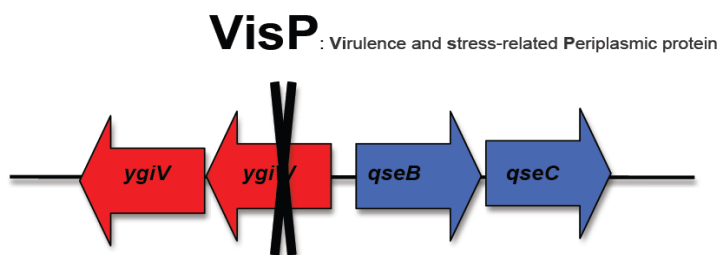


Fig.1 - Organização dos operons *qseBC* e *ygiVW* em *S. Typhimurium*. Renomeado *visP* ao invés de *ygiW*, baseado em sua função (MOREIRA *et al.*, 2013).

Inicialmente VisP surgiu após a realização de análises transcriptômicas de um *oligo-array* realizado no mutante *qseC* (MOREIRA *et al.*, 2013), gerado por mutagênese de λ Red (DATSENKO; WANNER, 2000; RASKO *et al.*, 2008), comparativamente à amostra selvagem. Esta análise genômica apontou *visP* como gene mais expresso, uma expressão 65 vezes

aumentada no mutante *qseC* em *S. Typhimurium*, coerentemente com resultados preliminares para *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e semelhante a outro estudo prévio em *S. Typhimurium* (CIRILLO *et al.*, 1998). VisP associa fatores de virulência e funções celulares básicas, como metabolismo, estrutura de membrana bacteriana, estresse, conectando as mesmas com a sinalização química através de AI-3, Epi e NE, também presentes em EHEC, em *S. Typhimurium* via QseBC (SPERANDIO *et al.*, 2003).

LpxO é um exemplar de proteína integral de membrana, pertencente à família das dioxigenases $\text{Fe}^{2+}/\text{O}_2/\alpha$ -cetoglutarato-dependentes. Apresenta seu sítio catalítico voltado ao citoplasma e dois domínios transmembrana (um no N-terminal e outro C-terminal). Caracterizada por catalisar a reação de 2-hidroximiristilação no Lipídio A (Figura 2) de *S. Typhimurium*, apresentando homólogos em outras espécies de bactérias (GIBBONS *et al.*, 2008).

Figura 2 - Esquema da reação catalisada por LpxO

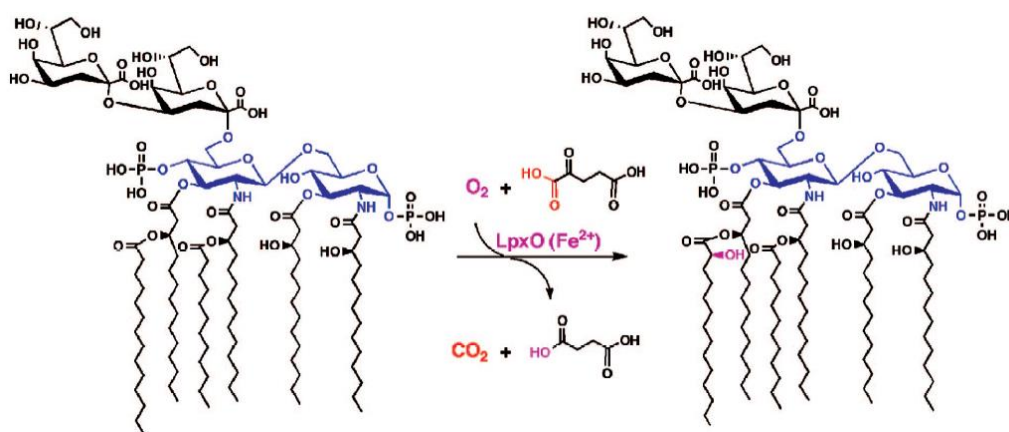


Fig. 2- Esquema da reação de 2-hidroximiristilação no Lipídio A catalisada pela enzima LpxO (GIBBONS *et al.*, 2008).

Também relacionou-se, previamente, VisP com diferenças no perfil de LPS de membrana (MOREIRA *et al.*, 2013), importante para resistência a CAMPs, diretamente relacionado à virulência. Especificamente modificações do Lipídio A em *S. Typhimurium*, conforme visualizado por separação via cromatografia em camada fina (Figura 3) (MOREIRA *et al.*, 2013), onde se identifica uma acentuação da adição de grupos –OH (indicados por flechas), mediado por LpxO, identificada por espectrometria de massas. Essas modificações foram acentuadas no mutante *visP*, porém ausentes nos mutantes gerados para *lpxO* e nocaute duplo *visP/lpxO*, conforme esperado (Figura 3). Consistentemente, estes perfis foram recuperados após complementação dos respectivos genes.

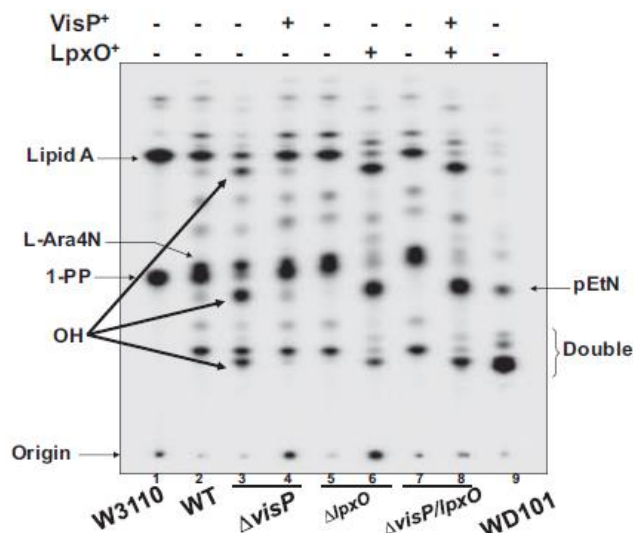
Figura 3 - Cromatografia em camada fina de Lipídio-A marcado com ^{32}P 

Fig. 3 _ Cromatografia em camada fina de Lipídio-A marcado com ^{32}P de *E. coli* K 12 W3110 e WD101 (controles), *S. Typhimurium* tipo selvagem, ΔvisP , ΔlpxO , $\Delta\text{lpxO/visP}$, e linhagens complementadas. Modificações avaliadas são aminoarabinose (L-Ara4N), 1-di-fosfato (1-PP), fosfoetanolamina (pEtN), modificações duplas no Lipídio-A (double), e dioxigenase mediado por LpxO (OH) (MOREIRA *et al.*, 2013).

Estes mutantes quando testados em macrófagos apresentaram redução na sobrevivência e proliferação na linhagem J774 (MOREIRA *et al.*, 2013). É importante salientar a sobrevivência celular como um passo essencial durante o processo patogênico de *S. Typhimurium*. A estrutura de VisP em *S. Typhimurium* foi também previamente modelada (Figura 4) (MOREIRA *et al.*, 2013), assim como a determinação de seu sítio de interação com açúcares de baixo peso molecular, característica das proteínas da família BOF (GINALSKI *et al.*, 2004).

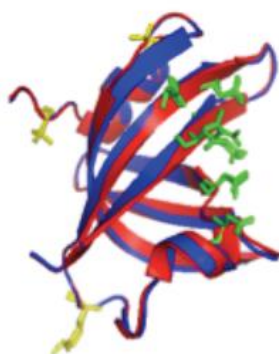
Figura 4 - Modelo de VisP de *S. Typhimurium*

Fig. 4 - Modelo de VisP de *S. Typhimurium* (em azul), baseado na estrutura de *E. coli* (em vermelho) (Modeller e MacPyMol software). Em verde estão marcados os aminoácidos aspartato e glutamato, característicos de proteínas BOF, e em amarelo resíduos diferentes das duas estruturas sobrepostas.

VisP e LpxO foram previamente testados também *in vivo*, no qual seus papéis na virulência foram inicialmente estabelecidos. A característica de VisP é ser capaz de se ligar aos açúcares da camada de peptidoglicano e também à enzima de membrana interna LpxO. Diretamente após a ligação, VisP bloqueia a modificação específica, a miristilação 2-hidroxi do Lipídio A, mediada por LpxO (MOREIRA *et al.*, 2013).

Portanto, tanto VisP como LpxO possuem papel na virulência e resposta a estresse de *S. Typhimurium*, melhor compreendido após o emprego do seus respectivos mutantes em diferentes experimentos. VisP e LpxO interagem diretamente na membrana de *S. Typhimurium*, essa associação parece ser uma sintonia fina durante a patogênese, promovendo uma ligação entre sobrevivência, resposta a estresse e virulência, na qual a sinalização química possui um papel central, via a ação de hormônios de estresse do hospedeiro.

Funcionalmente VisP regula a resposta à fatores de estresse bacterianos, bem como indiretamente a Epi e NE importantes na virulência de diversas bactérias (RASKO *et al.*, 2008). Contudo, até o momento VisP não aparenta ter um papel na virulência em *Escherichia coli* patogênicas, como no caso EHEC (MOREIRA *et al.*, 2013), talvez devido ao fato de *E. coli* não possuir LpxO.

Esta integração de sistemas funcionais desempenha um papel inédito na interação e comunicação destes organismos, os inter-relacionados com a microbiota e/ou hospedeiro. Neste sentido, são apresentadas novas e empolgantes condições neste paradigma que surge na Microbiologia, tornando-se importante concentrar o foco em fatores de virulência e seus mecanismos de sinalização como alvos para novos tratamentos (CLATWORTHY *et al.*, 2007).

1.4. Regulação de montagem do antígeno-O via Wzz_(fepE) e Wzz_(ST)

O lipopolissacarídeo (LPS) é um complexo glicolipídio de bactérias Gram-negativas que contribui para as propriedades de estabilidade e permeabilidade da membrana externa (RAETZ; WHITFIELD, 2002) (Figura 5). O LPS de *S. Typhimurium* possui três distintos componentes: o Lipídio A, uma estrutura hidrofóbica composta de açúcares e ácidos graxos que ancora o LPS na membrana externa; um núcleo oligossacarídico, dividido em uma porção interna e uma externa; e o antígeno-O, um polissacarídeo constituído de unidades de repetição de três a seis açúcares, o qual se estende da superfície celular, ligado à porção externa do núcleo oligossacarídico (DELGADO *et al.*, 2006).

Figura 5 - Esquema ilustrativo da membrana de bactérias Gram-negativas e do LPS

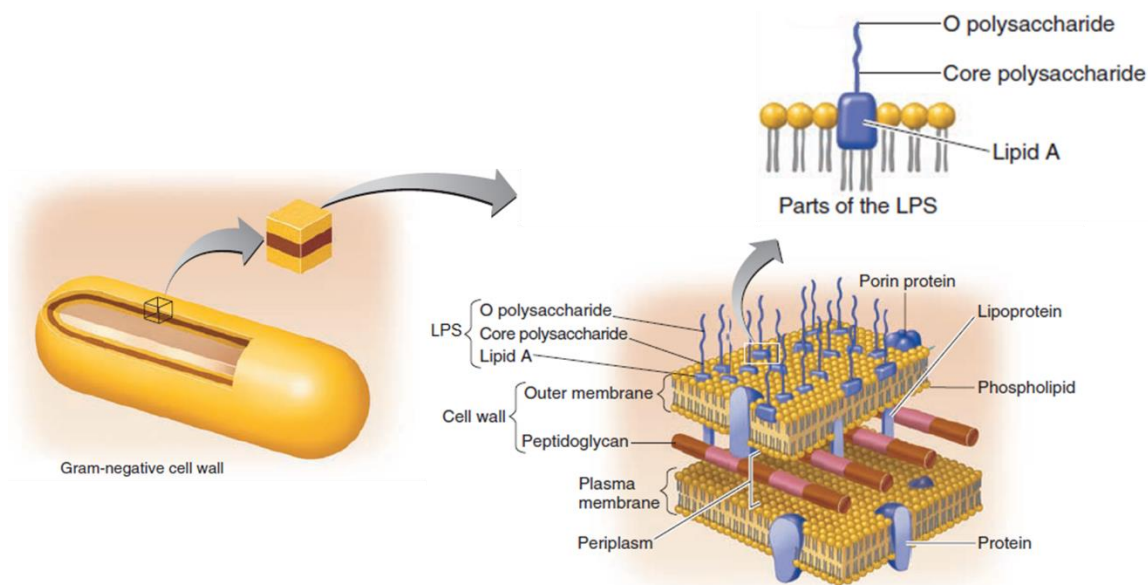


Fig. 5 - Esquema ilustrativo da membrana de bactérias Gram-negativas e da molécula do LPS, ancorado na membrana externa através do lipídio-A (TORTORA *et al.*, 2013).

O antígeno-O está envolvido na resistência à fagocitose, peptídeos catiônicos e sistema complemento, e estas atividades estão relacionadas ao comprimento da cadeia de antígeno-O (DELGADO *et al.*, 2006; HÖLZER *et al.*, 2009). A montagem do antígeno-O possui o sistema Wzz, constituinte da via biossintética dependente da polimerase Wzy, como regulador, o qual determina o comprimento final de sua cadeia polissacarídica (DANIELS; MORONA, 1999; MURRAY *et al.*, 2003), e também lhe confere uma distribuição tri-modal (MURRAY *et al.*, 2003; HÖLZER *et al.*, 2009) (Figura 6). O antígeno-O é um polímero de unidades de repetição tetrassacarídicas, as quais são montadas no lado citoplasmático da membrana interna, e então passado para o lado periplasmático da membrana, onde Wzy as polimeriza antes de ligá-las numa molécula de núcleo externo oligossacarídico (MURRAY *et al.*, 2003). As proteínas Wzz agem como uma “régua” molecular, possivelmente interagindo com a polimerase Wzy, formando grandes estruturas oligoméricas determinando padrões bem definidos no comprimento da cadeia de antígeno-O, criando assim uma distribuição modal, apesar disso, não são essenciais para a formação de antígeno-O (MURRAY *et al.*, 2003; TOCILJ *et al.*, 2008; HÖLZER *et al.*, 2009; WOODWARD *et al.*, 2010). Formando cadeias curtas (até 4 unidades de repetição), longas (de 16 a 35 unidades de repetição) e muito longas (acima de 100 unidades de repetição) de antígeno-O. As proteínas Wzz_{ST} e Wzz_{repE} regulam, respectivamente, a síntese das cadeias longa (L-OAg)

e muito longa (VL-OAg) (RAETZ; WHITFIELD, 2002; MURRAY *et al.*, 2003; DELGADO *et al.*, 2006; HÖLZER *et al.*, 2009) (Figura 6).

Figura 6 - Modalidade do comprimento da cadeia de antígeno-O de *S. Typhimurium*

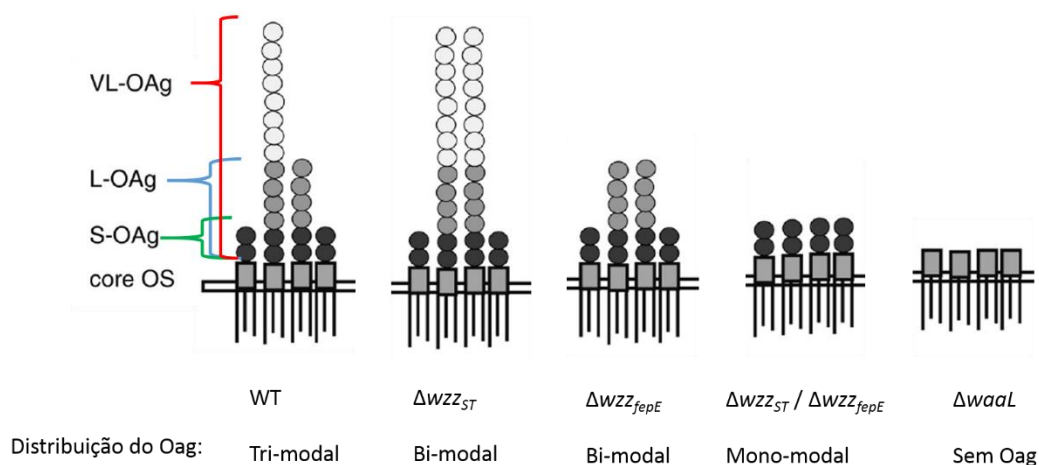


Fig. 6 - Distribuição tri-modal do comprimento da cadeia polissacarídica do antígeno-O do LPS de *S. Typhimurium* e seus respectivos reguladores: Wzz_{ST} responsável pelas cadeias longas (L-Oag), Wzz_{fepE} pelas muito-longas (VL-Oag) de antígeno-O, WaaL é a ligase que catalisa a ligação entre o núcleo externo do LPS e o antígeno-O (HÖLZER *et al.*, 2009). As cadeias curtas (S-Oag) não possuem moduladores de seu comprimento.

A regulação da expressão das proteínas Wzz é mediada pelos sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB (BasR/BasS) e pelo sistema RcsC/YojN/RcsB, os quais regulam a transcrição dos genes wzz, entre outros modificadores da estrutura do LPS, através de uma cascata de fosforilação de fatores de transcrição, ativada após receber estímulos específicos do meio externo, como baixa concentração de íons Mg²⁺ (DELGADO *et al.*, 2006) (Figura 7).

Figura 7 - Esquema representativo da regulação da montagem e estrutura do LPS de *S. Typhimurium*

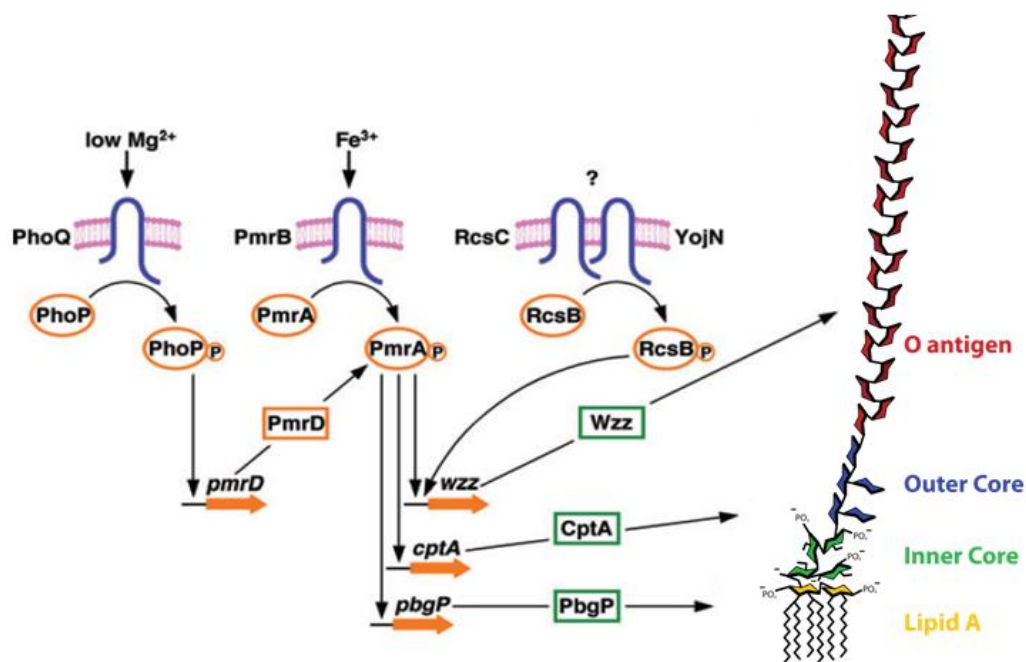


Fig. 7 - Esquema representativo dos genes e efetores responsáveis pela montagem e regulação da estrutura do LPS de *S. Typhimurium*, através dos sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB e do sistema RcsC/YojN/RcsB (DELGADO *et al.*, 2006). O sistema de dois componentes PmrA/PmrB também é chamado de BasR/BasS.

1.5. Motilidade e patogenicidade em *Salmonella*

Motilidade mediada por flagelo é usada pela *Salmonella* para se movimentar no lúmen intestinal, e é requisitada para uma eficiente colonização no trato intestinal, invasão celular e indução de patogênese (ERHARDT; DERSCH, 2015). Permite o benefício da elevada disponibilidade de nutrientes no intestino inflamado, e assim, iniciar o contato com a célula hospedeira e o processo de invasão (STECHER *et al.*, 2004; STECHER *et al.*, 2008). O flagelo é uma macroestrutura proteica de alta complexidade (Figura 8), a qual se utiliza de uma força prótica motriz para rotacionar sua estrutura e propeler a bactéria através de meios líquidos e semi-sólidos (*swimming*) e superfícies altamente viscosas (*swarming*) (Chevance e Hughes, 2008). As proteínas MotA e MotB formam os complexos estatores condutores de íon, os quais são necessários para a rotação do flagelo (BLAIR; BERG, 1990; BERG, 2003).

Figura 8 - Esquema representativo da macroestrutura proteica flagelar de *S. Typhimurium*.

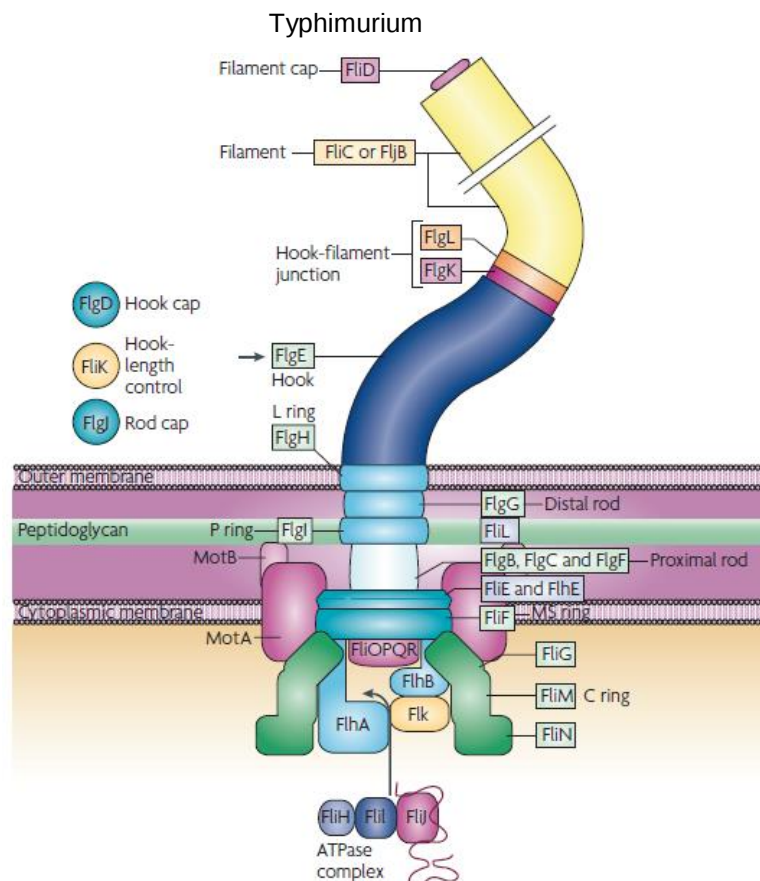


Fig. 8 - Esquema representativo da macroestrutura proteica flagelar de *S. Typhimurium* e seus respectivos constituintes proteicos (CHEVANCE; HUGHES, 2008).

Flagelo é produzido durante a colonização intestinal, entretanto sua produção é reprimida após a invasão de células epiteliais. Suas subunidades são potentes indutores da resposta imune do hospedeiro (HAYASHI *et al.*, 2001). A montagem desta macroestrutura ocorre através de uma complexa regulação transcricional temporal de mais de 60 genes, mediada por três distintas classes de promotores, os quais são organizados de forma hierárquica (CHEVANCE; HUGHES, 2008; ANDERSON *et al.*, 2010). O operon regulatório *flhDC* apresenta-se no topo desta cascata transcricional e controla a decisão fundamental de quando se produzir o flagelo. Sua expressão é ativada por um promotor de flagelo de Classe 1. As proteínas FlhD e FlhC formam um complexo heteromultimérico (FlhD₄C₂), o qual funciona como um ativador transcricional para promover a transcrição dos promotores de flagelo de classe 2 de forma dependente do fator de transcrição σ^{70} (YANAGIHARA *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2006) (Figura 9). Os promotores de classe 2 direcionam a transcrição de genes que são necessários para a estrutura e montagem do motor do flagelo, conhecido como HBB (*Hook Basal Body*). Após

terminado a formação do HBB, promotores de classe 3 são transcritos através do σ^{28} da RNA polimerase, chamado de FlhA (KARLINSEY *et al.*, 2000), o qual é específico para promotores do flagelo de classe 3 (OHNISHI *et al.*, 1990). Antes do término de HBB, este fator σ^{28} é inibido pelo fator anti- σ^{28} FlgM (CHADSEY *et al.*, 1998). Com a finalização do HBB, FlgM é secretado para o exterior da célula, presumidamente através da estrutura do HBB, iniciando a transcrição dependente de σ^{28} (KUTSUKAKE, 1994). Assim, genes de filamentos estruturais, como as flagelinas, produtos necessários após a formação do HBB, somente serão transcritos quando houver um motor funcional, sobre o qual eles poderão ser montados (OHNISHI *et al.*, 1990; CHEVANCE; HUGHES, 2008).

Figura 9 - Esquema representativo da regulação transcricional dos constituintes do flagelo

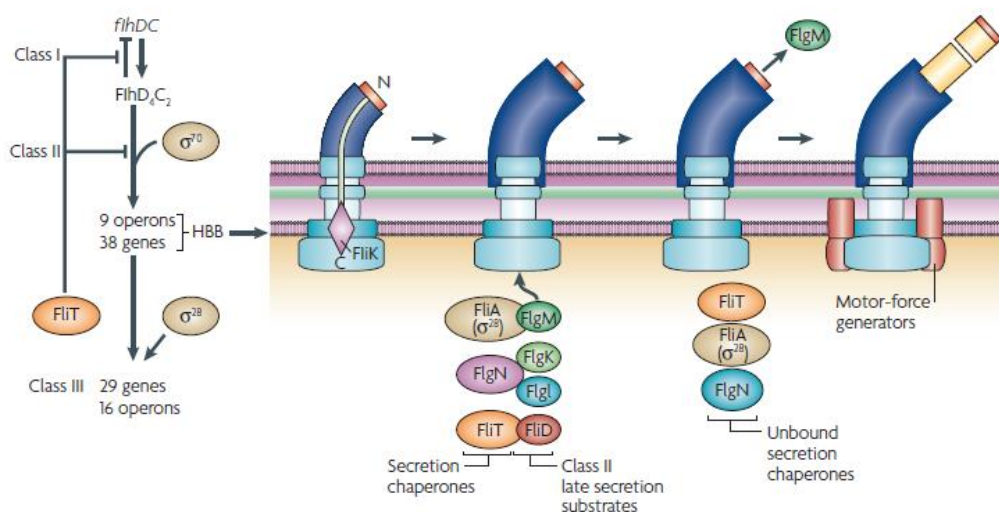


Fig. 9 - Esquema representativo da regulação transcricional dos constituintes do flagelo e a culminação na sua montagem (CHEVANCE; HUGHES, 2008).

A motilidade por *swarming* envolve uma translocação superficial por um grupo de células dependente de flagelo. Células *swimmers* são geralmente mais alongadas e apresentam uma maior quantidade de flagelo que células da mesma espécie propagando-se em meio líquido ou semi-sólido. Estas células se movimentam por uma mistura complexa de polissacarídeos, surfactantes, proteínas e peptídeos, os quais cercam a colônia. O antígeno-O é necessário para a motilidade via *swarming*, pois ele aumenta a molhabilidade da superfície da bactéria, auxiliando a movimentação no meio viscoso (TOGUCHI *et al.*, 2000).

1.6. Hipótese de estudos

A hipótese inicial deste estudo é investigar a formação da cadeia de antígeno-O do LPS de *S. Typhimurium*, onde VisP e LpxO aparentam estar envolvidos na formação e determinação do comprimento final das cadeias de antígeno-O do LPS de *S. Typhimurium* (Figura 10).

Figura 10 - Análise do comprimento final das cadeias de antígeno-O do LPS de *S. Typhimurium* por PAGE

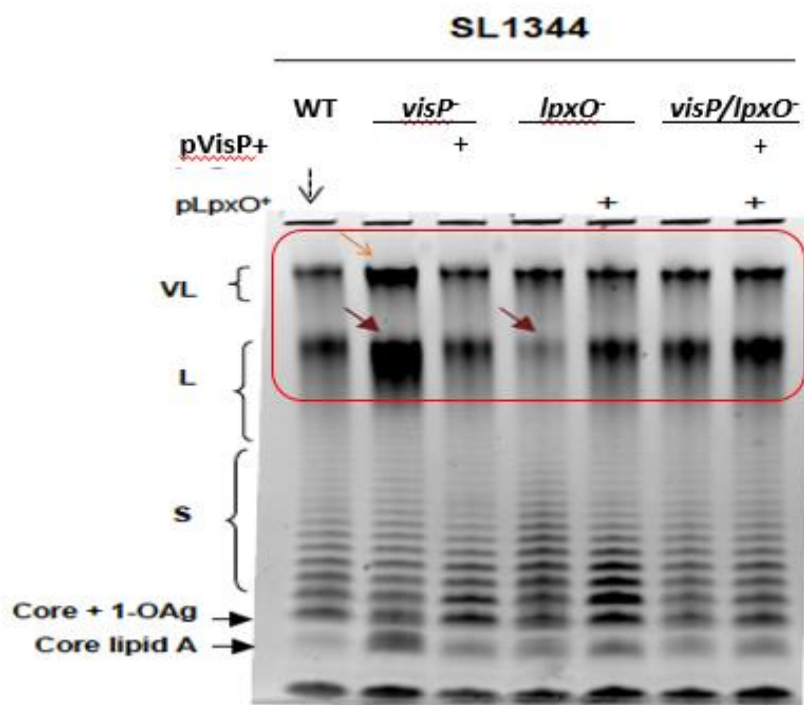


Fig. 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com coloração por prata de amostras purificadas de LPS de *S. Typhimurium* SL1344 tipo selvagem (WT), mutante de *visP*, *lpxO* e o duplo mutante *visP/lpxO*, assim como os seus respectivos complementados, evidenciando que há um aumento nas cadeias VL-OAg e L-OAg no mutante *visP* (setas laranja e marrom à esquerda, respectivamente), e reciprocamente há diminuição de L-OAg no mutante de *lpxO* (seta marrom à direita) (dados preliminares não publicados em colaboração com o Prof. M. Stephen Trent, University of Georgia).

A extensão da cadeia de antígeno-O, conjuntamente com a função de TTSS tem um papel importante na virulência de *S. Typhimurium* nos processos de invasão celular, mediado por SPI-1, e sobrevivência e replicação intracelular, mediado por SPI-2 (Figura 11). Com este estudo iremos iniciar o entendimento da função de VisP e LpxO nesta distribuição tri-modal de antígeno-O mediada Wzz_{ST} e Wzz_{fepE} (Figura 6).

Figura 11 - Modelo do papel da distribuição tri-modal dos diferentes comprimentos de antígeno-O na virulência de *S. Typhimurium*

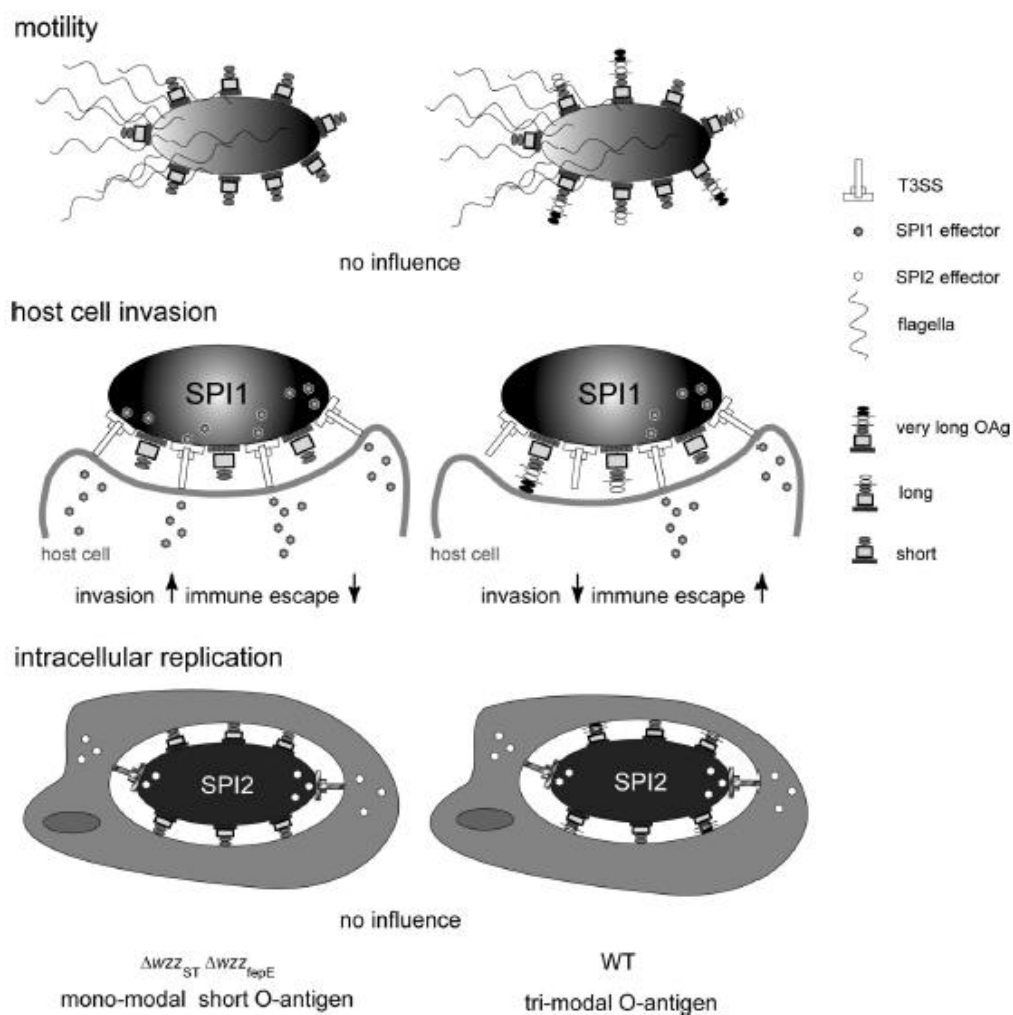


Fig. 11 Modelo do papel da distribuição tri-modal dos diferentes comprimentos de Antígeno-O na virulência de *S. Typhimurium*, tanto na motilidade, invasão via SPI-1 e sobrevivência intracelular via SPI-2 (HÖLZER *et al.*, 2009).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

I. Investigar o papel de VisP e LpxO e a participação dos mesmos na estrutura e montagem do antígeno-O, assim como a sua modulação via WZZ_{lepE} e WZZ_{ST}.

II. Caracterizar os mecanismos de finalização da estrutura de antígeno-O do LPS e suas implicações na patogenicidade de *S. Typhimurium*.

2.2 Objetivos específicos

I. Investigar a ação de VisP na motilidade e nos processos patogênicos mediados por SPI-1 e SPI-2 de *S. Typhimurium*.

II. Correlacionar VisP com LpxO nestes processos, assim como com as proteínas reguladoras do comprimento da cadeia de antígeno-O, WZZ_{lepE} e WZZ_{ST}.

III. Investigar o papel dos diferentes padrões da cadeia de antígeno-O, L-OAg e VL-OAg, na patogênese de *S. Typhimurium*.

IV. Correlacionar as modificações no LPS de *S. Typhimurium* relacionadas à VisP, com as mudanças fenotípicas causadas pela ausência desta proteína nos processos patogênicos.

3. Material e métodos

3.1. Cultivo e armazenamento de bactérias

Foram realizados estoques das cepas e mutantes necessários para as atividades a serem efetuadas no projeto. Tais cepas bacterianas estão disponíveis na coleção de bactérias do Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana (PASIQUIBAC), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, *campus* de Araraquara.

As cepas, contidas em criotubos, foram estriadas em placas de ágar LB, deixadas em cultivo *overnight* a 37 °C. Colônias isoladas foram repassadas para tubos com 3 mL de meio LB, mais um antibiótico específico para seleção no caso de cepas com marca de resistência. Após um crescimento *overnight* a 37 °C em *shaker*, coletou-se 1 mL da cultura, adicionou-se 0,5 mL de glicerol 50%, em criotubos, os quais foram estocados no *freezer* - 80 °C. No Quadro 1 apresentam-se as cepas que foram utilizadas nos ensaios de caracterização fenotípica e análise de expressão gênica.

Todo cultivo bacteriano foi realizado em crescimento *overnight* a 37 °C, com aeração e agitação em caldo LB, com exceção quando indicado no experimento.

Quadro 1 - Cepas bacterianas utilizadas neste estudo

Nº na Coleção	Descrição da cepa	Marca resistência diferencial	Origem
3	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium SL1344 (Wild-Type – WT)	Estreptomicina, Kanamicina	(HOISETH; STOCKER, 1981)
74	SL1344, mutante $\Delta visP$	Estreptomicina	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2013)
75	SL1344, mutante $\Delta visP$ complementado com pBADMyHisA (VisP+)	Ampicilina	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2013)
88	<i>Escherichia coli</i> K12 TOP10 com pBADMyHisA (<i>visP</i>)	Ampicilina	Coleção PASQUIBAC
95	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta lpxO$	Estreptomicina	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2013)
97	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta lpxO$, VisP+ (pBADMyHisA) e LpxO+ (pACYC184)	Ampicilina e Cloranfenicol	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2013)
100	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta lpxO$, LpxO+ (pACYC184)	Cloranfenicol	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2013)
109	Duplo-mutante $\Delta visP / \Delta lpxO$, VisP+ (pBADMyHisA)	Ampicilina	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2013)
156	SL1344, mutante Δwzz_{fepE}	Estreptomicina	Coleção PASQUIBAC
157	SL1344, mutante Δwzz_{ST}	Estreptomicina	Coleção PASQUIBAC
158	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz_{fepE}$	Cloranfenicol	Coleção PASQUIBAC
159	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$	Cloranfenicol	Coleção PASQUIBAC
163	SL1344, mutante $\Delta lpxO$	Cloranfenicol	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2013)
167	<i>Escherichia coli</i> K12 TOP10 com pBADMyHisA (<i>wzz(fepE)</i>)	Ampicilina	Coleção PASQUIBAC
169	SL1344, mutante $\Delta wzz(fepE)$ com pBADMyHisA (<i>wzz(fepE)</i> +)	Ampicilina	Coleção PASQUIBAC
170	SL1344, mutante $\Delta wzz(ST)$ com pBADMyHisA (<i>wzz(ST)</i> +)	Ampicilina	Coleção PASQUIBAC
171	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz(fepE)$ com pBADMyHisA (<i>wzz(fepE)</i> +)	Ampicilina	Coleção PASQUIBAC
172	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz(ST)$ com pBADMyHisA (<i>wzz(ST)</i> +)	Ampicilina	Coleção PASQUIBAC
184	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz(fepE)$ com pBADMyHisA (<i>visP</i> +)	Ampicilina	Presente estudo
185	SL1344, duplo-mutante $\Delta visP / \Delta wzz(ST)$ com pBADMyHisA (<i>visP</i> +)	Ampicilina	Presente estudo
192	SL1344 com pBADMyHisA (<i>wzz(fepE)</i> +)	Ampicilina	Presente estudo
193	SL1344, mutante Δwzz_{ST} com pBADMyHisA (<i>wzz(fepE)</i> +)	Ampicilina	Presente estudo

Quadro 1 - Cepas bacterianas utilizadas nos ensaios de caracterização fenotípica e análise de expressão gênica.

3.2. Complementação gênica

Para um maior entendimento da função gênica na patogenicidade e da interação gênica, as cepas mutantes foram complementadas com o gene deletado, inserido em um plasmídeo com promotor constitutivo. Além disso, foi feita inserção de *wzz_{fepE}* nas cepas 3 e 157 (Quadro 1), carregado por plasmídeo com promotor induzível para análise de superexpressão. O plasmídeo contendo o gene alvo foi transformado em amostras determinadas através do procedimento de transformação por eletroporação.

3.2.1. Extração plasmidial

Realizou-se um procedimento em pequena escala de extração de DNA plasmidial de suspensão de células bacterianas, as quais estão carreando o plasmídeo com o gene de interesse para a complementação, baseado no processo de lise alcalina. Foi utilizado o *kit* da Invitrogen *Quick Plasmid Miniprep*®.

O procedimento se baseia no fato que os plasmídeos são moléculas de DNA relativamente pequenas e supertorcidas e o DNA cromossomal bacteriano é muito maior e menos supertorcido. Essa diferença na topologia permite a precipitação seletiva do DNA cromossomal e proteínas celulares separadamente do plasmídeo e moléculas de RNA. Nas células que são lisadas em meio alcalino, que desnatura ambos os ácidos nucleicos e as proteínas, e que é posteriormente neutralizado com acetato de potássio, o DNA cromossomal e as proteínas precipitam por causa da impossibilidade de se renaturarem corretamente (por conta de seu grande tamanho). Os plasmídeos renaturam corretamente e permanecem em solução, eficientemente separados do DNA cromossomal e das proteínas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Nesse procedimento, são usadas três soluções principais, chamadas de *Ressuspension Buffer* (R3), *Lysis Buffer* (L7) e *Precipitation Buffer* (N4). A primeira solução (R3), que é adicionada ao precipitado de células preparadas com antecedência, contém Tris e EDTA. O Tris serve para tamponar a solução em pH 8,0, enquanto que o EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) é um quelante, que se liga a cátions bivalentes da camada lipídica, enfraquecendo o envelope celular (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Além disso, a solução R3 apresenta RNase A, a qual degrada o RNA em solução. A segunda solução (L7), que é adicionada após ressuspensão do precipitado na solução R3, contém SDS e hidróxido de sódio e tem a função de lisar a célula. O SDS é um detergente que dissolve os componentes lipídicos da membrana celular, bem como as proteínas celulares (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Já o NaOH desnatura o DNA cromossomal e plasmidial em fita simples, o DNA plasmidial circular permanece torcido (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A terceira solução (N4) é formada por acetato de potássio 3 M e ácido acético, sendo que este torna o pH novamente neutro, permitindo a renaturação das fitas de DNA. Os grandes segmentos de DNA cromossomais não podem re-hibridizar perfeitamente, mas colapsam em emaranhados parcialmente hibridizados. Ao mesmo tempo, o acetato de potássio precipita o SDS da suspensão celular junto com as proteínas e lipídeos. O DNA

cromossomal parcialmente re-hibridizado é aprisionado no precipitado SDS/lipídeo/proteína. Apenas o DNA plasmidial escapa do precipitado e permanece em solução (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Em seguida, a solução final obtida é centrifugada, e o sobrenadante é posto em uma coluna de separação, que se liga às moléculas de DNA plasmidial. O eluato é descartado. A coluna é lavada com a solução *Wash Buffer (W9)*, que contém etanol 70%, sendo então removidos os sais e o SDS remanescentes. Por fim, o DNA plasmidial é eluído da coluna com tampão Tris-EDTA, sendo em seguida medida a sua concentração através do espectrofotômetro *Nanodrop 2000®* da Thermo Scientific.

3.2.2. Preparo de bactérias para transformação genética

O procedimento de preparo de bactérias eletrocompetentes é extremamente simples, e possui o principal objetivo de retirar íons da suspensão celular através de sucessivas lavagens, reduzindo a força iônica. Assim a solução contendo a bactéria e o plasmídeo formam um meio isolante entre placas de um capacitor, que deixa passar uma intensa corrente elétrica em determinada voltagem, a qual gera poros na membrana da bactéria, permitindo a internalização do plasmídeo (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Inicialmente, foi feito um pré-inóculo com 3 mL de meio LB, crescimento *overnight* a 37 °C em *shaker*, os quais foram inoculados em um erlenmeyer com 150 mL de LB, deixados a 37 °C em *shaker* até atingir uma densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,6. Em seguida, a cultura foi posta em gelo por 30 minutos. Após foi passada para tubos cônicos de 50 mL, centrifugados em centrífuga refrigerada (4 °C) por 6 minutos a 2500 x *g*. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em água gelada, para uma nova centrifugação. Repetiu-se a lavagem com água gelada. Terminado, lavou-se com glicerol 10%, e ressuspendeu-se em 0,4 mL de glicerol 10%. Por fim, aliquotou em tubos de microcentrífuga, 50 µL cada (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), tais alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C.

3.2.3. Transformação genética por eletroporação

O procedimento de eletroporação foi feito com o eletroporador MicroPulser®, da BIO-RAD. Foi utilizada uma cubeta de 2 mm de espessura, a 2,5 kV. Eletroporou-se 100 µL de células eletrocompetentes, cepas 158 e 159 (Quadro 1), com 10 µL de suspensão de pBADMyHisA(*visP*+) (161,8 ng/µL); e cepas 3 e 157 (Quadro 1), com 10 µL de suspensão de pBADMyHisA(*wzz_{lepE}*+) (139,2 ng/µL). Após o choque, as células foram ressuspendidas em 1

mL de meio LB, deixadas em um *Shaker*, a 37 °C por uma hora. Depois da recuperação, foram plaqueados 50 µL, 100 µL e 200 µL da suspensão celular em placas contendo meio ágar LB com ampicilina (100 µg/mL), as quais foram cultivadas a 37 °C *overnight*. O plasmídeo pBADMyHisA apresenta marca de resistência à ampicilina, assim, somente bactérias que incorporaram o plasmídeo cresceram neste meio.

3.3. Ensaio de motilidade (*Swimming* e *Swarming*)

Foi realizado ensaios para avaliar a motilidade das cepas de forma a relacionar os genes estudados com a produção de flagelo, assim como o seu funcionamento. Para o ensaio de *swimming*, foram inoculados 5 µL de um cultivo em caldo LB *overnight* no centro de uma placa de meio LB semi-sólido (0,3% de ágar), perfurando o meio e inoculando em seu interior. Após 8 horas a 37°C, foi medido o diâmetro do halo de crescimento (SPERANDIO *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2010). O mesmo ensaio foi realizado com meio acrescido de 1,3 mM de L-arabinose, para indução de superexpressão através do promotor araBAD (GUZMAN *et al.*, 1995; SIEGELE; HU, 1997), presente no plasmídeo pBADMyHisA.

No ensaio de *swarming*, foram inoculados 5 µL de um cultivo em caldo LB *overnight* superficialmente no centro de uma placa de meio LB semi-sólido (0,5% de ágar). Após 48 horas a 37°C, foi medido o diâmetro do halo de crescimento (TOGUCHI *et al.*, 2000, modificado).

3.4. Cultivo de célula epitelial e macrófago

No presente estudo foram utilizadas duas linhagens distintas de células de mamíferos, células epiteliais HeLa (Laboratório de Biologia Celular – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP) e macrófagos murinos J774 (ATCC®), em ensaios posteriormente descritos. Ambos os tipos celulares foram cultivados em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Thermo Fisher®), acrescido de 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose, 1 mM piruvato sódico, 10% de soro fetal bovino e Penicilina-Estreptomicina (5000 U/mL, diluída 100x), em estufa com atmosfera de 5% CO₂, a 37°C.

3.5. Ensaio de invasão de células HeLa

A virulência das cepas do estudo foi mensurada através da quantificação da invasão em células epiteliais HeLa *in vitro* em ensaio com gentamicina, conforme descrito previamente (FINLAY *et al.*, 1991; FIERER *et al.*, 1993; PFEIFER *et al.*, 1999). Infectadas com um MOI

(*Multiplicity of infection*) de 100:1 durante 90 min a 37°C em 5% CO₂, com os inóculos bacterianos normalizados na mesma DO₆₀₀. As células bacterianas após interação com células HeLa, foram tratadas com gentamicina 30 µg/ml por 1h para matar as bactérias extracelulares remanescentes. Assim, após uma incubação extra de 3h a 37°C em 5% CO₂, lisou-se as células HeLa com solução de Triton-X 100 (1%). Por fim as bactérias foram diluídas serialmente e plaqueadas em ágar LB seletivo (com estreptomicina) para determinação das UFC (unidades formadoras de colônias) de cada cepa testada em triplicatas (FINLAY *et al.*, 1991; FIERER *et al.*, 1993; PFEIFER *et al.*, 1999).

3.6. Ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos

A virulência das cepas do estudo também foi mensurada *in vitro* através de ensaios de sobrevivência intracelular em macrófagos J774 com gentamicina, de forma a avaliar uma segunda etapa da patogênese de *S. Typhimurium* onde as bactérias estão internalizadas, conforme descrito previamente (FINLAY *et al.*, 1991; FIERER *et al.*, 1993; PFEIFER *et al.*, 1999). Infectadas com bactérias opsonizadas com soro de camundongo a 37°C durante 15 min e lavadas em PBS estéril, utilizando um MOI de 100:1 durante 30 min a 37°C em 5% CO₂, com os inóculos normalizados na mesma DO₆₀₀. Essas células bacterianas após interação com macrófagos J774, foram tratadas com gentamicina 30 µg/ml por 1h para matar as bactérias extracelulares remanescentes, assim após uma incubação extra de 3h a 37°C em 5% CO₂, os macrófagos J774 foram lisados com solução de Triton-X 100 (1%). Terminado este procedimento, as bactérias foram diluídas serialmente e plaqueadas em ágar LB, para determinação das UFC de cada cepa testada em triplicatas (FINLAY *et al.*, 1991; FIERER *et al.*, 1993; PFEIFER *et al.*, 1999).

3.7. Análise estatística

Os dados obtidos dos ensaios realizados foram normalizados pela cepa controle (*S. Typhimurium* SL1344, *Wild-type* - WT) e sua significância estatística foi estabelecida pelo análise de variância ANOVA, teste de Dunnet e teste de Tukey, utilizando-se o teste mais adequado para cada tipo de dados.

3.8. Extração de RNA

A técnica de extração de RNA consiste no uso de desnaturante forte; o método mais empregado utiliza TRIzol, que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, e ao ser adicionado rompe as células inativa a enzima RNase e dissolve os componentes celulares, enquanto mantém o RNA intacto. O clorofórmio é adicionado em seguida e separa a solução anterior em fases, sendo elas: aquosa (contém RNA); intermediária (DNA); orgânica (proteínas, membranas, organelas). Em seguida, a solução aquosa obtida é extraída e acrescida de etanol 100%, o qual irá solubilizar as moléculas de RNA. Esta solução é posta em uma coluna de separação, que se liga às moléculas de RNA. O eluato é descartado. A coluna é lavada com uma solução de etanol 70%, sendo então removidos os sais remanescentes. Por fim, o RNA é eluído da coluna, e tratado com DNase para uma maior purificação.

As cepas foram inoculadas em 3 mL de meio LB, postas em um crescimento sob agitação *overnight*, 37 °C. 500 µL deste crescimento foram inoculados em 25 mL de LB, e deixadas crescer até uma DO₆₀₀ de 1,0 em 37 °C sob agitação. Os 25 mL foram posteriormente centrifugados (2500 x g, 10 min). O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspenso em 500 µL de TRIzol® (Ambion™). Esta solução foi aquecida a 65 °C por 10 min, e posteriormente adicionada de 100 µL de clorofórmio, homogeneização via vórtex. A solução foi centrifugada a 10000 x g, 15 min, 4 °C para separação de fases. A fase superior aquosa foi retirada e posta em um novo tubo acrescida de 0,5 volume de etanol 100%. A partir desta etapa foi utilizado o kit de extração de RNA RiboPure™ Bacteria (Thermo Fisher Scientific).

3.9. Análise da expressão gênica por qRT-PCR

A técnica de qRT-PCR foi empregada, conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicadas biológicas, e cada uma em duplicatas experimentais (sextuplicata). Cada reação (20µL) continha o Master Mix SYBR®, Multi-scribe® reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) e RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific) adicionados, além de 100ng de RNA de amostra. As reações foram normalizadas com o emprego do *rpoA* (*RNA polymerase subunit A*) como gene de referência. Foi utilizado o equipamento QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific) para realização das reações. Os resultados obtidos pelo ensaio de qRT-PCR foram analisados pelo método de *Comparative critical threshold* ($\Delta\Delta CT$), conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006).

4. Resultados

4.1. Novas construções moleculares

As cepas de duplo-mutantes 158 ($\Delta visP$ / Δwzz_{fepE}) e 159 ($\Delta visP$ / Δwzz_{ST}) foram complementadas com o gene *visP* através de transformação com o plasmídeo pBADMycHisA, o qual contém o gene, obtendo-se as cepas 184 e 185. O plasmídeo pBADMycHisA, carreando o gene *wzz_{fepE}* com o promotor araBAD (induzível por arabinose), foi inserido por transformação nas cepas 3 (WT) e 157 (Δwzz_{ST}), para avaliar o efeito da superexpressão de *Wzz_{fepE}* na motilidade e se apresenta competição com *Wzz_{ST}* na interação com a polimerase Wzy.

4.2. Ensaios de motilidade (*Swimming* e *Swarming*)

Foram realizados ensaios de motilidade tipo *swimming* com as seguintes cepas 3, 74, 75, 95, 97, 100, 109, 156, 157, 158, 159, 169, 170, 171, 172, 184 e 185 (Quadro 1), conforme descrito no item 3.7. O mutante $\Delta visP$ apresentou redução de 70,61% na motilidade comparado à cepa tipo selvagem (WT), o que não foi evidenciado nos demais mutantes simples. Na análise comparativa de *VisP* e *LpxO*, foi observado que a deleção de *lpxO* no mutante de *visP* faz com que este recupere o fenótipo da cepa selvagem, entretanto a complementação de *lpxO* no duplo mutante $\Delta visP$ / $\Delta lpxO$ não foi suficiente para a apresentação do fenótipo do mutante simples de *visP* (Figura 12).

Figura 12 - Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas no ensaio de *Swimming*.

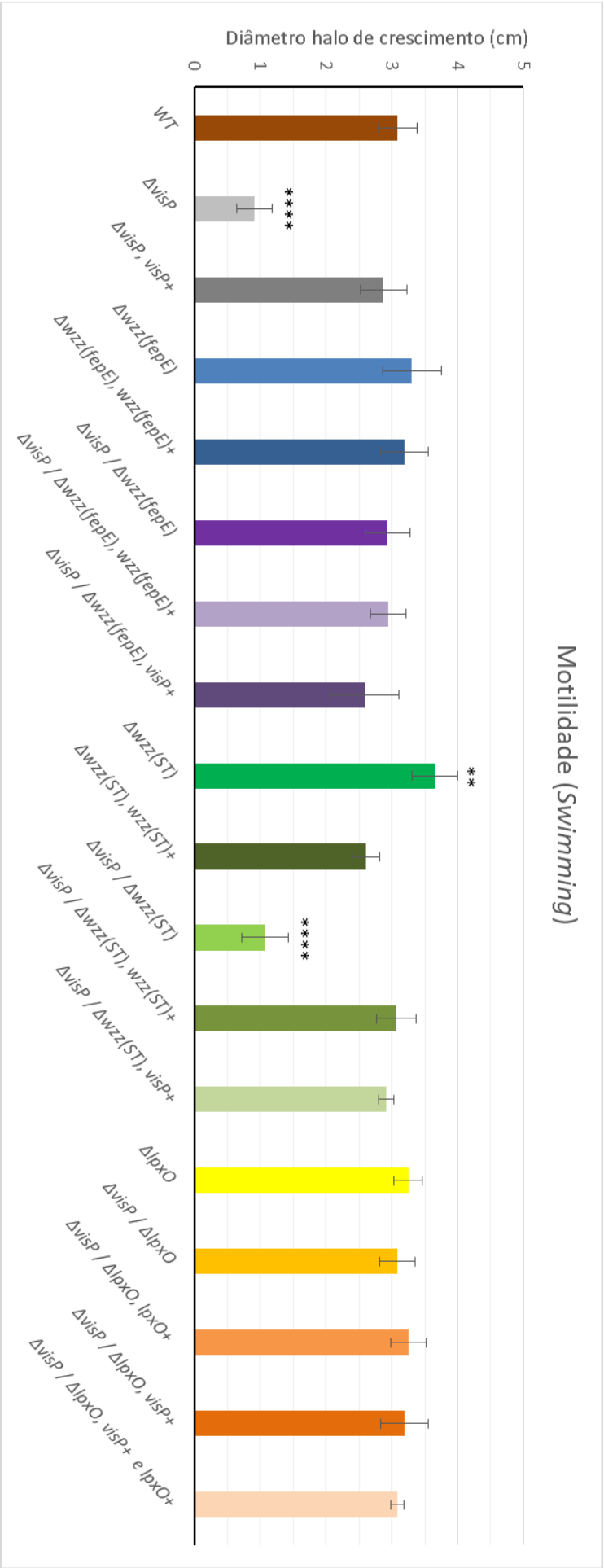


Fig. 12 - Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas em meio LB semissólido (0,3% ágar) após 8 horas em 37°C. Significância estatística em comparação com a cepa selvagem (WT), $p < 0,0001$ (****), $p < 0,005$ (**).

Comparando-se os papéis da proteína periplasmática VisP e os determinantes do comprimento final de antígeno-O, foi observado inicialmente que WZZ_{tepE} durante ensaios de motilidade possui uma relação semelhante a de VisP com LpxO, sendo que a deleção de *wzz_{tepE}* em $\Delta visP$ retorna o fenótipo da cepa selvagem, complementando a redução na motilidade causada pela deleção de *visP*. No entanto, o duplo mutante $\Delta visP$ / Δwzz_{tepE} complementado com o gene *wzz_{tepE}* não retorna ao fenótipo de $\Delta visP$, como esperado (Figura 12).

O mutante simples Δwzz_{ST} apresentou um aumento de 18,52% na motilidade comparado à cepa selvagem. Diferentemente dos respectivos mutantes $\Delta lpxO$ e Δwzz_{tepE} , a ausência de WZZ_{ST} em $\Delta visP$ não recuperou o fenótipo da cepa selvagem, apresentando o mesmo fenótipo de $\Delta visP$, desta forma, o duplo mutante se comporta como $\Delta visP$ (Figura 12), indicando o papel de *wzz_{ST}* na motilidade de *S. Typhimurium*. A complementação de *visP* no duplo mutante $\Delta visP$ / Δwzz_{ST} apresentou o mesmo fenótipo de Δwzz_{ST} , significância de $P < 0,001$, e diferença do duplo mutante não complementado numa significância de $P < 0,0001$. A complementação deste duplo mutante com *wzz_{ST}* não apresentou o fenótipo de $\Delta visP$, como esperado (Figura 12).

No ensaio de motilidade (*swimming*) com indução de expressão por arabinose (1,3 mM no meio semi-sólido), foi evidenciado que a superexpressão de WZZ_{tepE}, responsável pelas cadeias VL-Oag, na cepa selvagem e no mutante Δwzz_{ST} não reduz a capacidade de motilidade como é observado na amostra $\Delta visP$ e duplo-mutante $\Delta visP$ / Δwzz_{ST} . Desta forma, é mostrado que WZZ_{tepE} não está diretamente relacionada com a baixa motilidade da cepa $\Delta visP$, e que a sua ausência neste mutante, mesmo recuperando o fenótipo da cepa selvagem, acarreta esta mudança de forma indireta (Figura 13).

Figura 13 - Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas, evidenciando o efeito da superexpressão de Wzz_{fepE} na motilidade *Swimming*

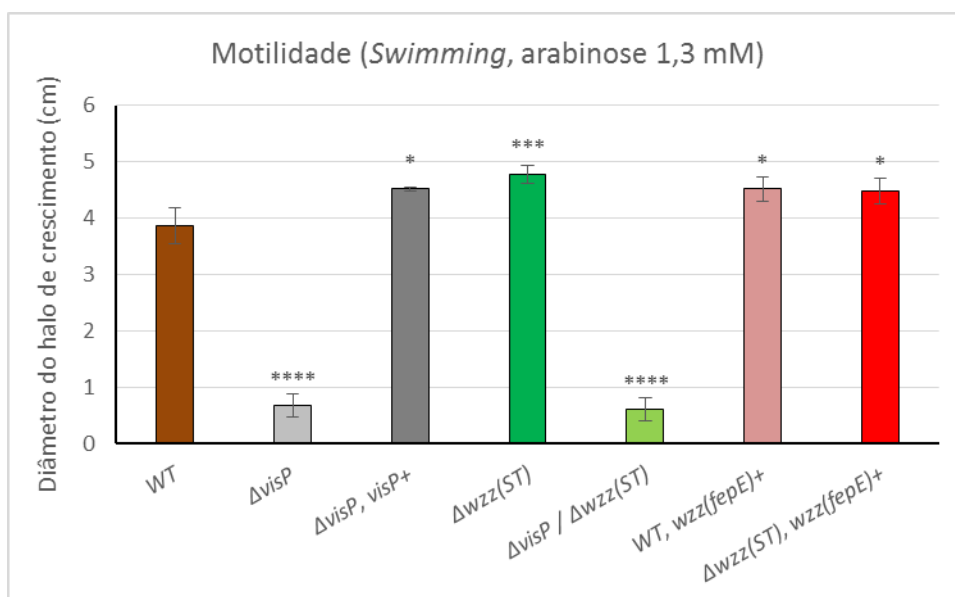


Fig. 13 - Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas em meio LB semissólido (0,3% ágar e arabinose 1,3 mM) após 8 horas em 37°C, evidenciando o efeito da superexpressão de Wzz_{fepE} na motilidade, induzida por arabinose. Significância estatística em comparação com a cepa selvagem (WT), $p < 0,0001$ (****), $p < 0,001$ (***), $p < 0,05$ (*).

Diferente do observado nos ensaios de motilidade *swimming*, no processo de *swarming*, a cepa ΔvisP apresentou o mesmo fenótipo da cepa selvagem (Figura 14). Desta maneira, as modificações decorrentes da ausência de VisP não afetam este tipo de motilidade em superfícies altamente viscosas. Além disso, a cepa duplo-mutante $\Delta\text{visP} / \Delta\text{wzz}_{\text{ST}}$ apresentou um aumento de 59,02% na motilidade comparado com a cepa selvagem (Figura 14), oposto do observado no ensaio de *swimming* (redução de 65,28%).

Figura 14 - Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas no ensaio de Swarming.

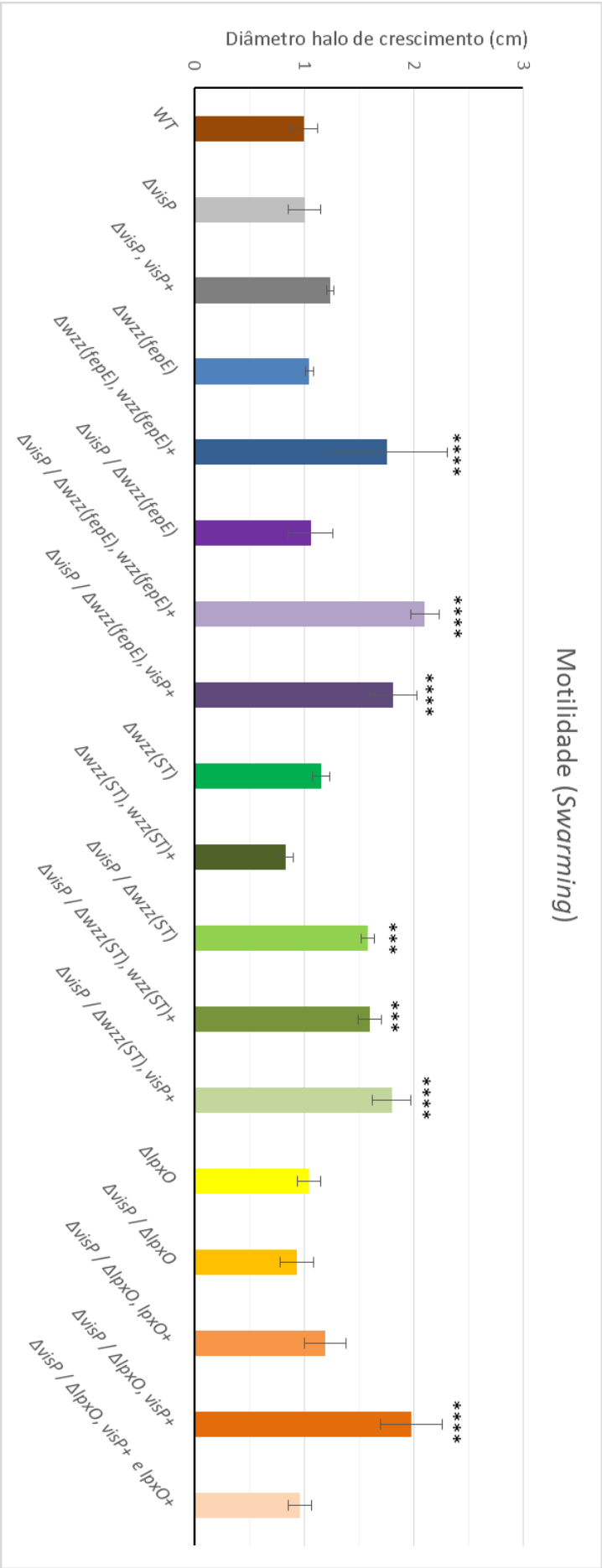


Fig. 14 - Medidas do diâmetro do halo de crescimento em centímetros das cepas estudadas em meio LB (0,5% ágar) após 48 horas em 37°C. Significância estatística em comparação com a cepa selvagem (WT), $p < 0,0001$ (****), $p < 0,001$ (***).

4.3. Ensaios fenotípicos em células epiteliais e macrófagos

Para avaliar o fenótipo de virulência, foram realizados ensaios de invasão de células HeLa e de sobrevivência intracelular em macrófagos J774 das cepas 3, 74, 75, 95, 97, 100, 109, 156, 157, 158, 159, 169, 170, 171 e 172 (Quadro 1). Tanto para os ensaios de invasão como para os de sobrevivência intracelular, o mutante em *visP* apresentou acentuada redução de atividade comparado à cepa selvagem (WT) em uma ordem de magnitude de 1,2 e 1,0 respectivamente (Figura 15 e 16), semelhante aos dados previamente descritos (MOREIRA *et al.*, 2013). Na relação entre a proteína periplasmática VisP e a enzima modificadora de lipídio-A LpxO, foi possível observar que a deleção de *lpxO* no mutante $\Delta visP$ faz com que este recupere o fenótipo do tipo selvagem em ambos processos, invasão e sobrevivência intracelular (Figuras 15 e 16). Entretanto, a complementação de *lpxO* no duplo mutante $\Delta visP / \Delta lpxO$ não foi suficiente para a apresentação do fenótipo do mutante simples $\Delta visP$ (Figuras 15 e 16). Durante a invasão de células epiteliais HeLa, a cepa $\Delta visP / \Delta lpxO$ complementada de *lpxO* apresentou, como esperado, fenótipo similar ao da cepa $\Delta visP$, com aproximadamente 1 ordem de magnitude de redução em relação aos níveis da cepa selvagem (Figura 15). Em contrapartida, durante a sobrevivência intracelular, o fenótipo apresentou-se apenas na cepa $\Delta visP$ (Figura 16).

Figura 15 - Análise quantitativa da invasão de *S. Typhimurium* em células epiteliais HeLa

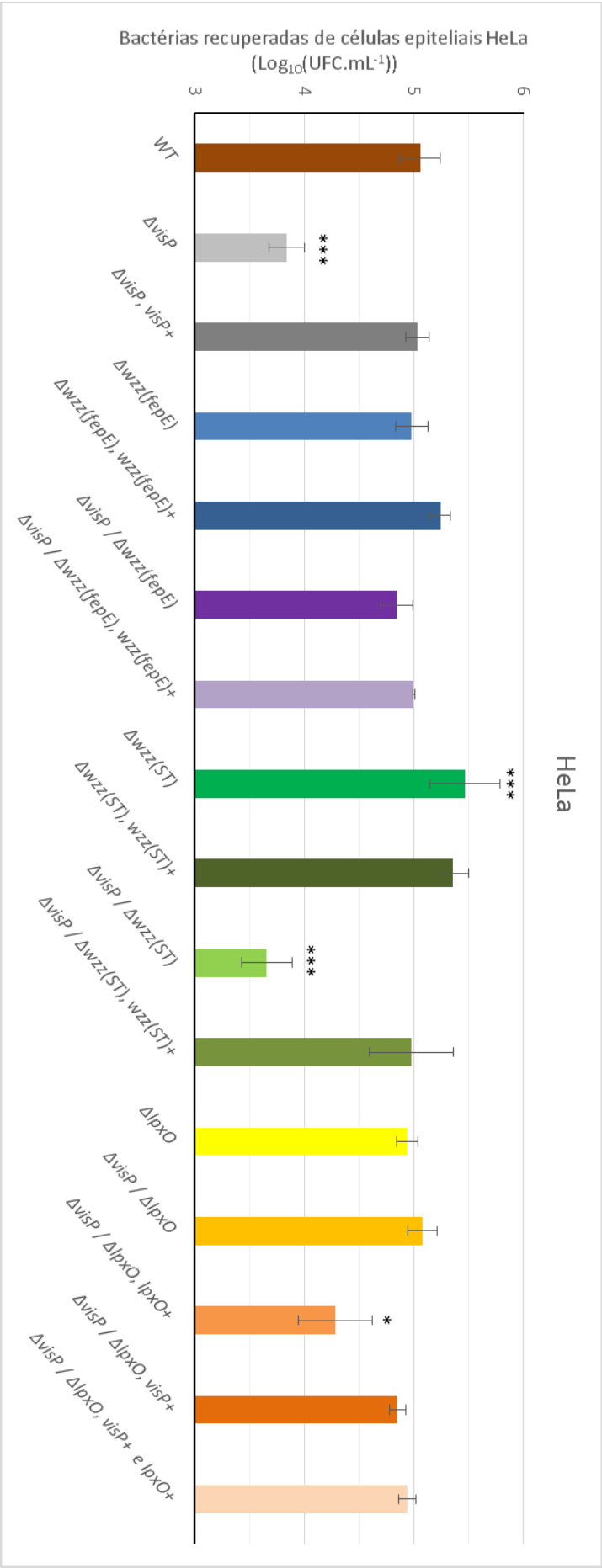


Fig. 15 - Análise quantitativa da invasão de *S. Typhimurium* em células epiteliais HeLa em MOI de 100:1, comparando-se a influência de VisP, Wzz_{fepE}, Wzz_{ST} e LpxO neste processo, assim como a sua interação. Significância estatística em comparação com a cepa selvagem (WT), $p < 0,001$ (***), $p < 0,1$ (*) neste caso baixa significância.

Figura 16 - Análise quantitativa da sobrevivência intracelular de *S. Typhimurium* em macrófagos J774

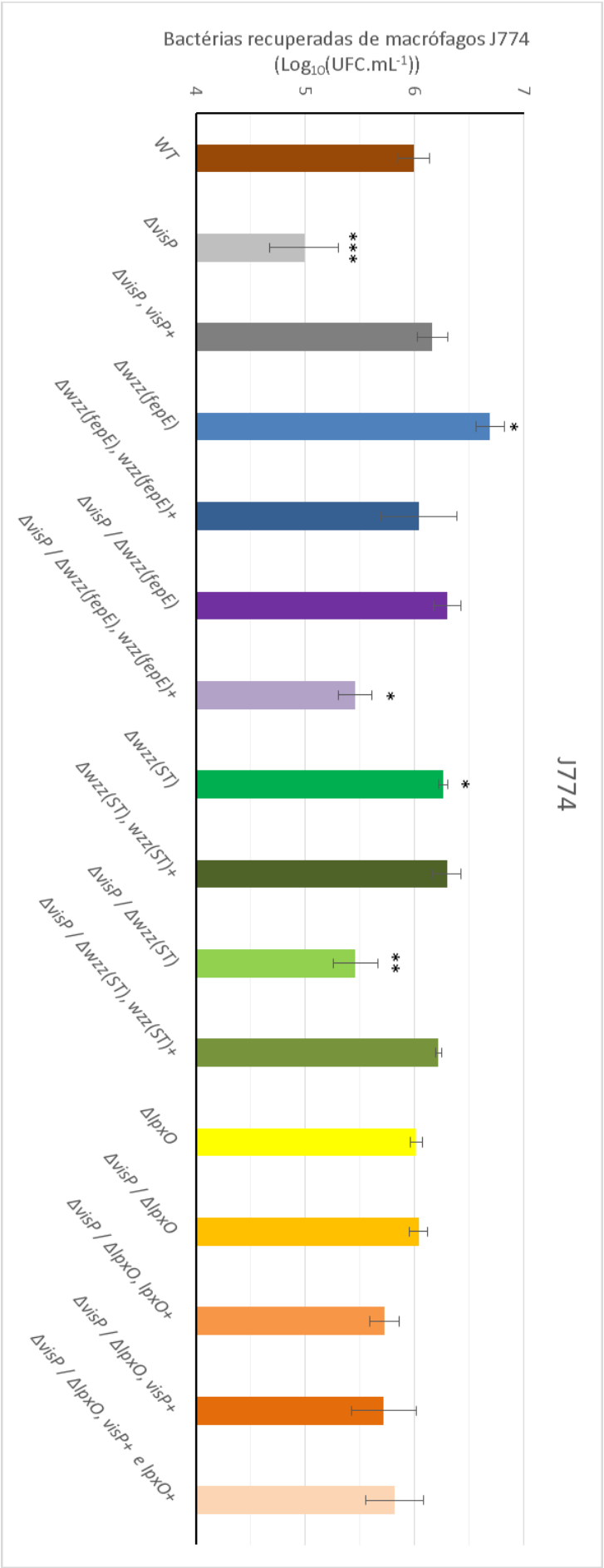


Fig. 16 - Análise quantitativa da sobrevivência intracelular de *S. Typhimurium* em macrófagos J774 em MOI de 100:1, comparando-se a influência de VisP, WZz_{fepE}, WZz_{ST} e LpxO neste processo, assim como a sua interação. Significância estatística em comparação com a cepa selvagem (WT), $p < 0,001$ (***), $p < 0,005$ (**), $p < 0,05$ (*) neste caso baixa significância.

Na análise de VisP e a proteína WZZ_{tepE}, responsável pelas formas muito longas de antígeno-O (Figura 6), durante a invasão celular, não houve diferenças significativas, apenas a cepa $\Delta visP$ apresentou redução de 1 ordem de magnitude (Figura 15). Contudo a cepa ΔWZZ_{tepE} apresentou um pequeno aumento na capacidade de sobrevivência intracelular quando comparado com a cepa selvagem, 0,7 ordem de magnitude (Figura 16). Comparando-se os papéis de VisP e WZZ_{tepE} nos processos de invasão e sobrevivência intracelular, foi observada uma relação antagônica, em que a deleção de *wzz_{tepE}* em $\Delta visP$ apresenta o fenótipo da cepa selvagem (Figuras 15 e 16), complementando a redução da atividade nestes processos devida à ausência de VisP, que apresenta ambas acentuadas, as formas L-OAg e VL-OAg (Figura 10). No entanto, o duplo mutante $\Delta visP / \Delta WZZ_{tepE}$, complementado com o gene *wzz_{tepE}*, não retorna ao fenótipo de $\Delta visP$ durante o processo de invasão (Figura 15), já no caso de sobrevivência intracelular, é observado uma redução do fenótipo em comparação ao selvagem, com 0,53 ordem de magnitude, porém não atinge os níveis do mutante $\Delta visP$ (Figura 16).

Comparando-se agora VisP e a outra proteína determinante do comprimento final da cadeia de antígeno-O, responsável pela forma longa, WZZ_{ST}, inicialmente observou-se que o mutante simples ΔWZZ_{ST} apresentou um aumento na capacidade de invasão celular comparado à cepa selvagem (Figura 15), e de forma menos acentuada, durante a sobrevivência intracelular (Figura 16). Assim como ocorreu na motilidade, foi observado aqui também que a ausência de WZZ_{ST} em $\Delta visP$ não recuperou o fenótipo da cepa selvagem, apresentando o mesmo fenótipo de $\Delta visP$ para o ensaio de invasão, e na sobrevivência intracelular, respectivamente com redução maior que 1 e 0,5 ordem de magnitude em relação à cepa selvagem (Figuras 15 e 16). Diferentemente do observado no caso de WZZ_{tepE}, a complementação parcial do duplo mutante $\Delta visP / \Delta WZZ_{ST}$ com *wzz_{ST}* não apresentou o fenótipo de $\Delta visP$, como se esperava (Figuras 15 e 16), resultado que pode ser justificado devido a diferenças nos níveis de expressão entre o gene singular cromossomal e o complementado episomal em cópias múltiplas.

4.4. Análise de expressão gênica

Foram realizados ensaios de análise de expressão gênica através da técnica de qRT-PCR para as cepas 3, 74, 156, 158 e 159, para genes envolvidos na motilidade, *flhDC*, *fliA*, *motA* (Figura 17); genes de SPI-1 e relacionados à invasão de células epiteliais, *sopB*, *invF* e *sipA* (Figura 18); e genes envolvidos no transporte de Mg²⁺, *mgtB*, e regulação da montagem do

antígeno-O, *basS* ou *pmrB* (Figura 19). Na análise dos genes envolvidos na motilidade, a cepa $\Delta visP$ apresentou expressão de *motA*, envolvido na movimentação do flagelo, 31 vezes menor do que a cepa selvagem, e para os genes reguladores da cascata de montagem e regulação do flagelo, *flhDC* e *fliA*, a redução está acima de 10000 vezes (Figura 17). A cepa Δwzz_{fepE} apresentou aumento na expressão de *motA* (1,8 x) e *fliA* (2,5 x) em relação à cepa selvagem (Figura 17). Da mesma maneira, a deleção de *wzz_{fepE}* no mutante $\Delta visP$ fez com que aumentasse os níveis reduzidos da expressão destes genes, alcançando níveis próximos da cepa selvagem, *flhDC* (0,78 x) e *motA* (0,79 x), e até mesmo superior, para *fliA* (1,65 x) (Figura 17). A cepa $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$, apesar do fenótipo de motilidade reduzido como $\Delta visP$ (Figura 12), apresenta níveis aumentados na expressão destes genes envolvidos na motilidade, em comparação com a cepa $\Delta visP$, e mais próximos da cepa selvagem (0,41 x para *flhDC*, 0,76 x para *fliA* e *motA*, em relação à cepa selvagem) (Figura 17).

Figura 17 - Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de *S. Typhimurium* de genes envolvidos na motilidade

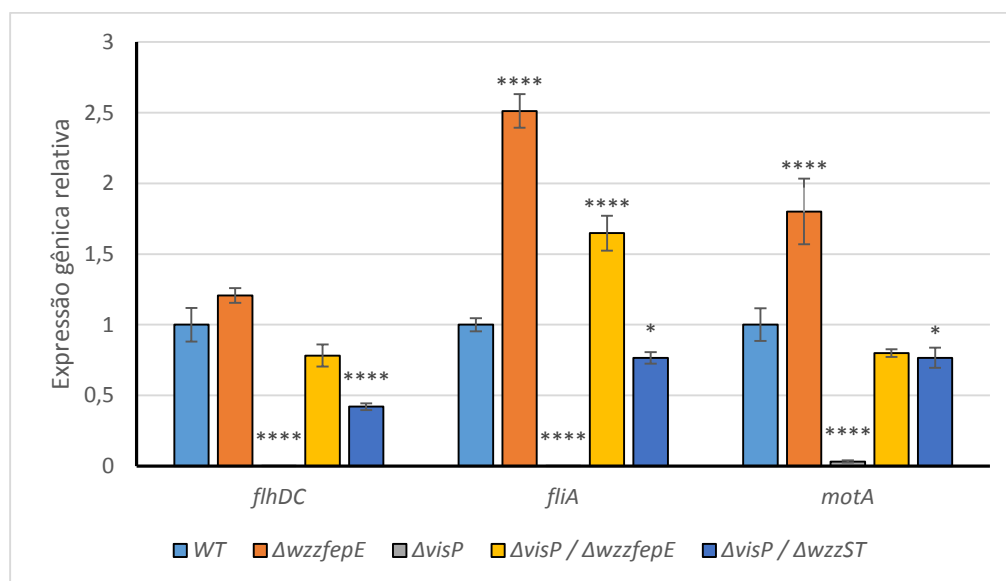


Fig. 17 - Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de *S. Typhimurium*, dos mutantes Δwzz_{fepE} , $\Delta visP$, $\Delta visP / \Delta wzz_{fepE}$ e $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ de genes envolvidos na motilidade, calculados pelo método de *Comparative critical threshold* ($\Delta\Delta CT$), conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). Significância estatística em comparação com a cepa selvagem (WT), $p < 0,0001$ (****), $p < 0,05$ (*).

Na análise dos genes envolvidos na invasão celular mediada por SPI-1, a cepa $\Delta visP$ apresentou expressão acima de 10000 vezes menor do que a cepa selvagem para os três genes analisados, *sopB*, *invF* e *sipA* (Figura 18). Nenhuma das cepas analisadas apresentou níveis de

expressão superiores à cepa selvagem (Figura 18). A deleção de *wzz_{sepE}* na cepa $\Delta visP$ fez com que aumentassem os níveis reduzidos da expressão destes genes em torno de 1000 x (Figura 18). A cepa $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$, apesar do fenótipo de invasão de células epiteliais reduzido como a cepa $\Delta visP$ (Figura 15), apresenta níveis aumentados na expressão destes genes envolvidos na invasão em torno de 5000 x, em comparação com a cepa $\Delta visP$ (Figura 18), porém reduzidos em 2 ordens de magnitude em relação à cepa selvagem para os 3 alvos testados (Figura 18), dado significativo que atesta a redução da invasão em relação à cepa selvagem.

Figura 18 - Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de *S. Typhimurium* de genes envolvidos no processo patogênico de invasão celular mediada por SPI-1

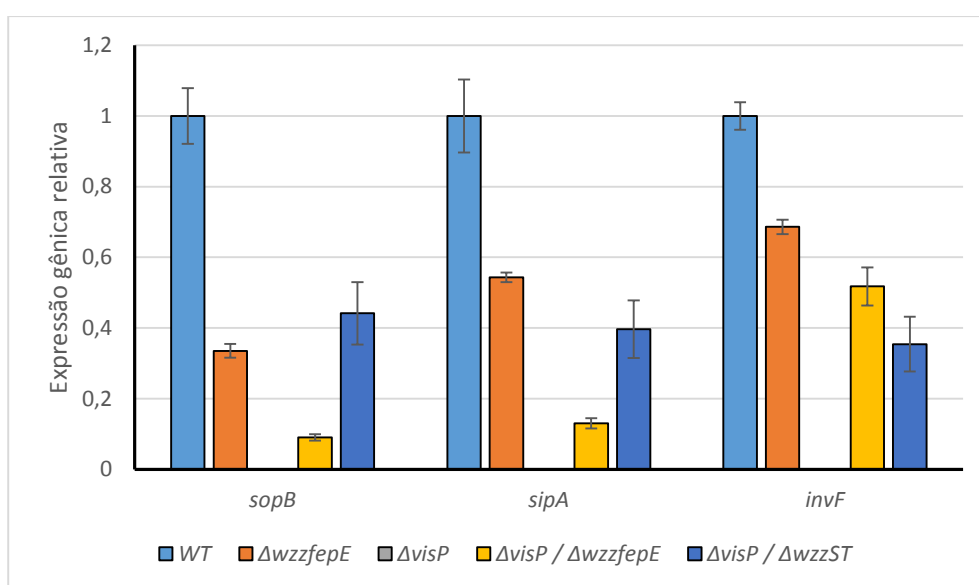


Fig. 18 - Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de *S. Typhimurium*, dos mutantes Δwzz_{sepE} , $\Delta visP$, $\Delta visP / \Delta wzz_{sepE}$ e $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ de genes envolvidos no processo patogênico de invasão celular mediada por SPI-1, calculados pelo método de *Comparative critical threshold* ($\Delta\Delta CT$), conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). Todas amostras demonstraram diferença estatística da amostra selvagem (WT) com $p < 0,0001$.

A cepa $\Delta visP$ apresentou expressão 100000 vezes menor do que a cepa selvagem para o gene *basS* (Figura 19), o qual codifica o sensor quinase do sistema de dois componentes BasR/BasS (PmrA/PmrB), envolvido na patogênese e regulação da montagem do LPS (Figura 7) (DELGADO *et al.*, 2006). A deleção de *wzz_{sepE}* em $\Delta visP$, aumenta a expressão deste gene em 22000 x, e a deleção de *wzz_{ST}* em $\Delta visP$ aumenta em 36000 x (Figura 19).

A cepa $\Delta visP$ apresentou expressão 100000 vezes menor do que a cepa selvagem para o gene *mgtB* (Figura 19), o qual codifica uma ATPase transpostadora de Mg^{2+} , envolvido na patogênese e sobrevivência em ambientes com baixa concentração de Mg^{2+} , como o SCV

(*Salmonella* containing vacuole) dentro de macrófagos (GARCIA VESCOVI *et al.*, 1996; SONCINI *et al.*, 1996; BADER *et al.*, 2005; PROST *et al.*, 2007). A deleção de *wzz_{fepE}* em $\Delta visP$, aumenta a expressão deste gene em 10000 x, e a deleção de *wzz_{ST}* em $\Delta visP$ aumenta em 15000 x (Figura 19).

Figura 19 - Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de *S. Typhimurium* dos genes *basS* e *mgtB*

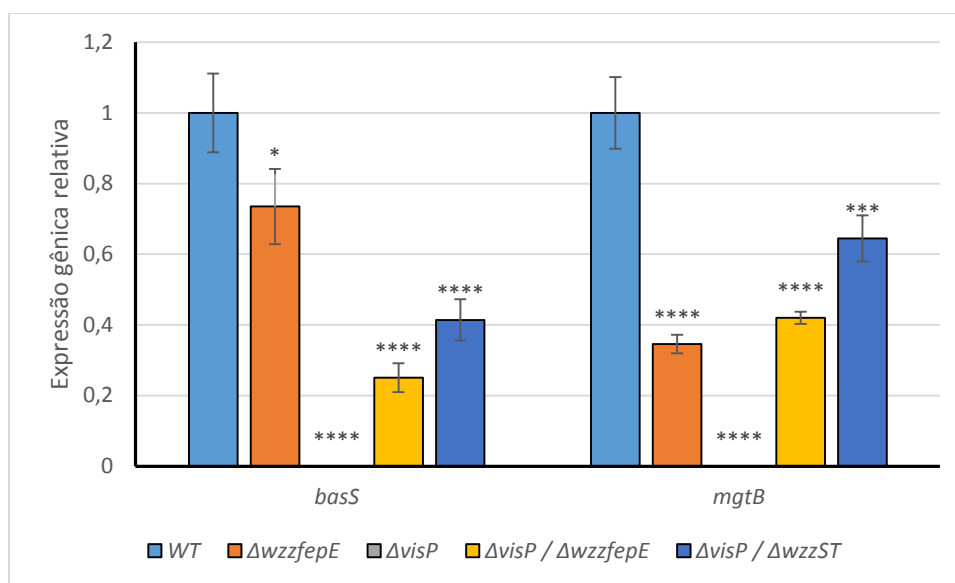


Fig. 19 - Expressão gênica relativa aos níveis da cepa selvagem de *S. Typhimurium*, dos mutantes Δwzz_{fepE} , $\Delta visP$, $\Delta visP / \Delta wzz_{fepE}$ e $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ dos genes *basS* e *mgtB*, calculados pelo método de *Comparative critical threshold* ($\Delta\Delta CT$), conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). Significância estatística em comparação com a cepa selvagem (WT), $p < 0,0001$ (****), $p < 0,001$ (***), $p < 0,05$ (*).

4.5. Discussão

S. Typhimurium é considerado um dos principais patógenos de fonte alimentar de origem bacteriana e ainda é um dos principais modelos de patogenicidade em bactérias Gram-negativas. Apesar de muitos processos já desvendados em sua patogenicidade, muitos detalhes de regulação da resposta frente à colonização do hospedeiro ainda são desconhecidos.

A motilidade mediada por flagelo é usada pela *Salmonella* para se movimentar no lúmen intestinal, e é requisitada para uma eficiente colonização no trato intestinal (ERHARDT; DERSCH, 2015). Recentemente nosso grupo descreveu a relação direta de VisP na virulência de *S. Typhimurium* (MOREIRA *et al.*, 2013), e observamos também que a sua deleção causa uma redução considerável na capacidade de motilidade (Figura 12). Já o presente estudo também aborda os papéis da enzima LpxO de lipídio A, Wzz_{ST} e Wzz_{fepE}, proteínas responsáveis

por modular a montagem das formas longas (L-OAg) e muito longas (VL-OAg) de antígeno-O, respectivamente. Foi observado que a deleção dos genes *lpxO* e *wzz_{lepE}* no mutante $\Delta visP$ faz com que a bactéria recupere o fenótipo de motilidade, nos níveis da cepa tipo selvagem. Em contrapartida, a deleção do gene *wzz_{ST}* não causou modificação do fenótipo no mutante $\Delta visP$ (Figura 12). Evidenciou-se a redução da capacidade de motilidade causada pela ausência de VisP, demonstrando uma relação direta com este processo, entretanto a recuperação do fenótipo selvagem ocasionado pela mutação de outros genes (*lpxO* e *wzz_{lepE}*) pode mostrar que o papel de VisP não esteja relacionado diretamente na montagem do flagelo, mas talvez participando na resposta a fatores de estresse bacteriano e indiretamente age na funcionalidade do flagelo, bem como demais mecanismos necessários durante o processo patogênico. A cepa $\Delta visP$ apresentou uma baixa expressão de genes envolvidos no controle da montagem e expressão do flagelo, *flhDC* e *fliA*, e também em sua movimentação, *motA* (Figura 16), condizendo com o seu fenótipo de baixa motilidade (Figura 12). A baixa expressão de *motA* pode resultar na falta de movimentação do flagelo (BLAIR; BERG, 1990; BERG, 2003), a de *fliA* acarreta a não-maturação, pois é um regulador de genes dos filamentos estruturais (OHNISHI *et al.*, 1990; CHEVANCE; HUGHES, 2008), e *flhDC* é o regulador inicial da cascata que resulta na montagem do flagelo (YANAGIHARA *et al.*, 1999). A deleção de *wzz_{lepE}* no mutante $\Delta visP$ elevou a expressão para os mesmos níveis da amostra selvagem dos genes *flhDC* e *motA*, já para *fliA* a expressão foi 1,65 vez maior do que a cepa selvagem (Figura 17), estando de acordo com a recuperação do fenótipo de motilidade da cepa selvagem (Figura 12). A cepa Δwzz_{lepE} apresentou significativo aumento na expressão dos genes *fliA* e *motA* em relação à cepa selvagem, demonstrando uma relação entre *Wzz_{lepE}* e a funcionalidade do flagelo. No entanto, não acarretou diferença significativa em seu fenótipo de motilidade, aumento de apenas 7,22% em relação à cepa selvagem (Figura 12). A deleção de *wzz_{ST}* no mutante $\Delta visP$ também elevou os níveis de expressão dos genes *flhDC*, *fliA* e *motA*, assim como a deleção de *wzz_{lepE}*, em relação ao mutante simples de *visP*, para níveis próximos da cepa selvagem (*fliA* e *motA*), e de forma mais amena para *flhDC* (0,42 vez a expressão na cepa selvagem) (Figura 17). Em contrapartida, o fenótipo de motilidade da cepa $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ é semelhante ao do mutante $\Delta visP$ (Figura 12), ou seja, mesmo com uma elevada expressão de genes envolvidos na regulação e funcionamento do flagelo, a motilidade permanece afetada, indicando um fator desconhecido, interferindo neste processo. Pode-se inferir que FlgM está agindo nesta cepa, não

sendo secretada (KUTSUKAKE, 1994), impedindo a ação de FliA (CHADSEY *et al.*, 1998; CHEVANCE; HUGHES, 2008), o que resultaria na não-maturação do flagelo e baixa motilidade. Em termos de expressão dos genes alvos testados, as principais diferenças entre as cepas $\Delta visP$ / Δwzz_{ST} e $\Delta visP$ / Δwzz_{fepE} está nos reguladores transcricionais de classe 1, *flhDC*, e de classe 2, *fliA*, os quais apresentam-se duas vezes menos expressos em $\Delta visP$ / Δwzz_{ST} , o que poderia acarretar mudanças em reguladores de classe 2, pela ação de FlhD₄C₂, ou na finalização da estrutura do filamento e/ou via quimiossensora, pela ação de FliA. Em termos de estrutura de antígeno-O, a cepa $\Delta visP$ / Δwzz_{fepE} apresenta alto nível de L-OAg, modificação causada pela ausência de VisP (Figura 10), e baixo nível de VL-OAg, pela ausência de seu modulador Wzz_{fepE}; em contrapartida, a cepa $\Delta visP$ / Δwzz_{ST} apresenta alto nível de VL-OAg, modificação causada pela ausência de VisP (Figura 10), e baixo nível de L-OAg, pela ausência de seu modulador Wzz_{ST}. Esta modificação na estrutura da membrana externa de alto nível de VL-OAg pode realizar a função de aumentar a resistência, como um mecanismo de defesa, e simultaneamente, diminuir a expressão de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) como a flagelina de fase 1, FliC, acarretando na baixa motilidade, conforme observado para antígeno-O capsular (MARSHALL; GUNN, 2015). O antígeno-O do LPS de *S. Typhimurium* é formado por estruturas tetrassacarídicas, chamadas unidades de repetição (RU), e cada uma acrescenta aproximadamente 1 nm no comprimento da cadeia de antígeno-O (KASTOWSKY *et al.*, 1992). As cadeias L-OAg, moduladas por Wzz_{ST}, apresentam de 16 a 35 RUs, enquanto que as VL-OAg, moduladas por Wzz_{fepE}, possuem em torno de 100 Rus, ou em torno de 100 nm (MURRAY *et al.*, 2003). O flagelo apresenta uma estrutura multiprotomérica denominada *hook* (“gancho”), cuja curvatura determina a propulsão do flagelo, função semelhante a de uma hélice, e tal estrutura apresenta um comprimento de aproximadamente 55 nm (HIRANO *et al.*, 1994). Visto que a deleção de *visP* faz com que haja uma superexpressão das cadeias L-OAg e VL-OAg (Figura 10), e a deleção de seus respectivos moduladores, *wzz_{ST}* e *wzz_{fepE}*, diminui consideravelmente sua expressão (HÖLZER *et al.*, 2009) devido ao mecanismo distributivo de Wzy (ZHAO *et al.*, 2014), assim, pode-se inferir que há uma interação entre o flagelo e as cadeias VL-OAg, de forma que a superexpressão destas causa um impedimento espacial na rotação do flagelo, já que estas cadeias apresentam um tamanho superior ao do gancho do apoio do flagelo, podendo ocasionar um atrito eletroestático entre estas estruturas, conforme hipotetizado em modelo (Figura 20). Esta hipótese corrobora com o fato da cepa $\Delta visP$ / Δwzz_{ST} apresentar níveis

superexpressos das cadeias VL-OAg, devido à deleção de *visP*, e baixo fenótipo de motilidade, apesar de expressão de genes da regulação e funcionamento do flagelo em níveis próximos ao da cepa selvagem; a cepa $\Delta visP / \Delta wzz_{fepE}$ apresentar um fenótipo de motilidade semelhante ao da cepa selvagem, e que a superexpressão de VL-OAg causada por VisP, possivelmente é afetada pela ausência de Wzz_{fepE}, a qual modula este tipo de cadeia; e a cepa $\Delta visP / \Delta lpxO$, retorna os níveis de VL-OAg aos da cepa selvagem (Figura 10), interação esta ainda não compreendida, e também recupera o fenótipo de motilidade da cepa selvagem, afetado anteriormente pela mutação simples de *visP* (Figura 12).

Figura 20 - Esquema mostrando como as formas muito longas do antígeno-O poderiam impedir a rotação do flagelo através do atrito eletroestático.

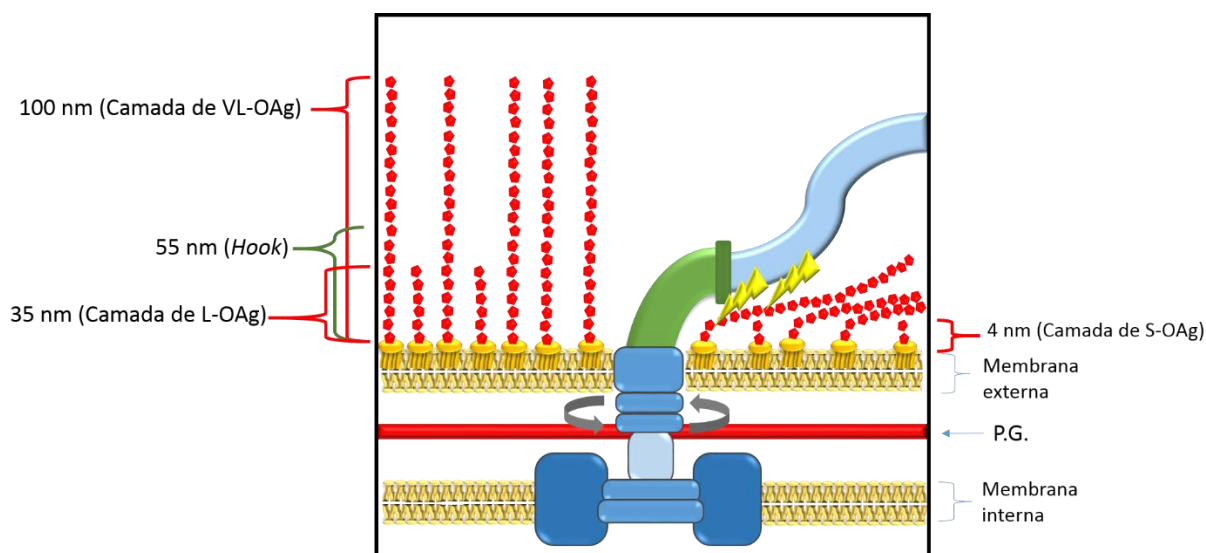


Fig. 20 - Esquema mostrando como as formas muito longas do antígeno-O poderiam impedir a rotação do flagelo através do atrito eletroestático entre as cadeias VL-OAg (100 nm de comprimento, vermelho) e o gancho do flagelo (55 nm de comprimento, verde) (Figura criada pelo autor deste trabalho).

A superexpressão de Wzz_{fepE} na cepa selvagem e em Δwzz_{ST} , induzida por arabinose, não causou diferença significativa na motilidade em relação à cepa selvagem (Figura 13). Entretanto já foi demonstrado que as proteínas Wzz não determinam a quantidade das formas L-OAg e VL-OAg, apenas a modalidade, ou seja, a superexpressão destas proteínas não acarreta no aumento do nível das cadeias de antígeno-O determinadas por elas, sendo que a quantidade das cadeias de antígeno-O depende de Wzy (RAETZ; WHITFIELD, 2002; WOODWARD *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2014), a qual pode-se hipotetizar que interage com VisP, devido ao fenótipo de antígeno-O observado no mutante $\Delta visP$ (Figura 10).

A relação entre antígeno-O do LPS e motilidade mediada por flagelo é demonstrada através da baixa motilidade causada pela ausência da estrutura do antígeno-O através de mutação deletéria de proteínas importantes que medeiam a sua montagem como WbaP (ILG *et al.*, 2009), WaaL (TOGUCHI *et al.*, 2000; HÖLZER *et al.*, 2009; MORGENSTEIN *et al.*, 2010) e Wzx (ZHOU *et al.*, 2014). Entretanto, não encontramos trabalhos que correlacionem alta expressão de antígeno-O com motilidade, visto que não há evidências de modelos naturais de alta expressão desta estrutura, principalmente das estruturas de maior comprimento, como L-OAg e VL-OAg, como é observado no mutante $\Delta visP$ (Figura 10). Portanto, este modelo apresenta um fenótipo de antígeno-O não observado até então, em que a baixa motilidade está associada à grande quantidade de cadeias de antígeno-O muito longas (VL-OAg), e não à sua ausência, como reportado anteriormente (ILG *et al.*, 2009).

O antígeno-O é necessário para a motilidade via *swarming*, pois ele aumenta a molhabilidade do exterior da bactéria em superfícies altamente viscosas, diferente de meios líquidos e semi-sólidos (*swimming*), auxiliando a movimentação neste meio viscoso (TOGUCHI *et al.*, 2000). Desta maneira, o fenótipo de motilidade via *swarming* do mutante $\Delta visP$, semelhante ao da cepa selvagem (Figura 14), pode estar relacionado ao aumento das formas L-OAg e VL-OAg (Figura 10), as quais aumentam a molhabilidade, e assim, contrabalanceam a possível deficiência no flagelo, observada através da expressão dos genes *flhDC*, *fliA* e *motA* nesta cepa (Figura 17). O aumento no fenótipo de motilidade via *swarming* da amostra $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ em relação à amostra selvagem de 59,02% (Figura 14), pode ser devido à somatória do alto nível de formas VL-OAg, com o aumento da expressão dos genes envolvidos na regulação da montagem e funcionalidade do flagelo (Figura 17).

De maneira diferente ao previamente descrito (HÖLZER *et al.*, 2009), a proteína Wzz_{ST}, responsável pelas formas longas de antígeno-O, parece de fato diminuir a invasão em células epiteliais, conforme observado através do aumento na invasão pela cepa Δwzz_{ST} (Figura 15), porém não observamos diferenças significativas na invasão do mutante de wzz_{sepE}, responsável por codificar as formas muito longas de antígeno-O, ou seja, mais protegidas imunologicamente da ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro conforme o modelo previamente proposto (HÖLZER *et al.*, 2009).

As análises fenotípicas dos duplo mutantes Δ/pxO e Δwzz_{sepE} , ambos na deleção de *visP*, revelaram uma complementação do fenótipo, pois estes duplo mutantes apresentaram níveis

próximos ao da cepa tipo selvagem durante a invasão de células epiteliais não fagocíticas (Figuras 15). Ou seja, foram capazes de restaurar o fenótipo apresentado pelo mutante $\Delta visP$ de redução de 1,2 ordem de magnitude em relação à cepa selvagem. Em contrapartida, o duplo mutante $\Delta visP$ com a deleção de wzz_{ST} apresentou os mesmos níveis do mutante simples $\Delta visP$. Na análise de expressão de genes envolvidos no processo de invasão celular, a cepa mutante $\Delta visP$ apresentou níveis extremamente baixos para os genes *sopB*, *sipA* e *invF* (Figura 18). A deleção de wzz_{fepE} no mutante de *visP* causou maior expressão transcricional destes genes do que no mutante simples $\Delta visP$, porém estes ainda apresentaram níveis mais baixos de expressão em relação à cepa selvagem (Figura 18), porém se comparado com os dados da análise fenotípica, estes foram suficientes para recuperação do fenótipo de invasão de células epiteliais HeLa (Figura 15). Já a deleção de wzz_{ST} causou um maior aumento na expressão destes genes (Figura 18), e apresentou fenótipo de invasão semelhante ao mutante $\Delta visP$, com redução de mais de uma ordem de magnitude em relação à cepa selvagem (Figura 15). O aumento da expressão de *invF* indica possivelmente um aumento na formação do injectissoma do TTSS de SPI-1, aliada ao aumento da expressão de proteínas efetoras, como SopB e SipA, poderia resultar no aumento da capacidade de invasão de $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ em relação à $\Delta visP$, o que não foi observado. Talvez outras proteínas efetoras ou componentes estruturais do TTSS de SPI-1 apresentem perfil diferencial neste caso, os quais deveriam ser utilizados para conclusões mais detalhadas sobre o fenótipo aqui descrito. A estrutura externa do injectissoma do TTSS de SPI-1 apresenta em torno de 80 nm de comprimento (KUBORI *et al.*, 1998). O duplo mutante $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ não possui as formas longas de antígeno-O, ou seja, apenas as VL-OAg acentuadas, as quais apresentam em torno de 100 nm de comprimento (MURRAY *et al.*, 2003). Assim, o alto nível das formas VL-OAg do mutante $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ poderia dificultar o acesso do injectissoma à membrana da célula epitelial, que de fato foi observado com uma redução de 1,5 ordem de magnitude em relação a cepa selvagem (Figura 15), impedindo este de inserir as proteínas efetoras que medeiam o processo de invasão (Figura 21), diminuindo a eficiência do processo, conforme proposto anteriormente (HÖLZER *et al.*, 2009).

Figura 21 - Esquema mostrando como as formas muito longas do antígeno-O poderiam impedir o TTSS de atingir a membrana da célula epitelial

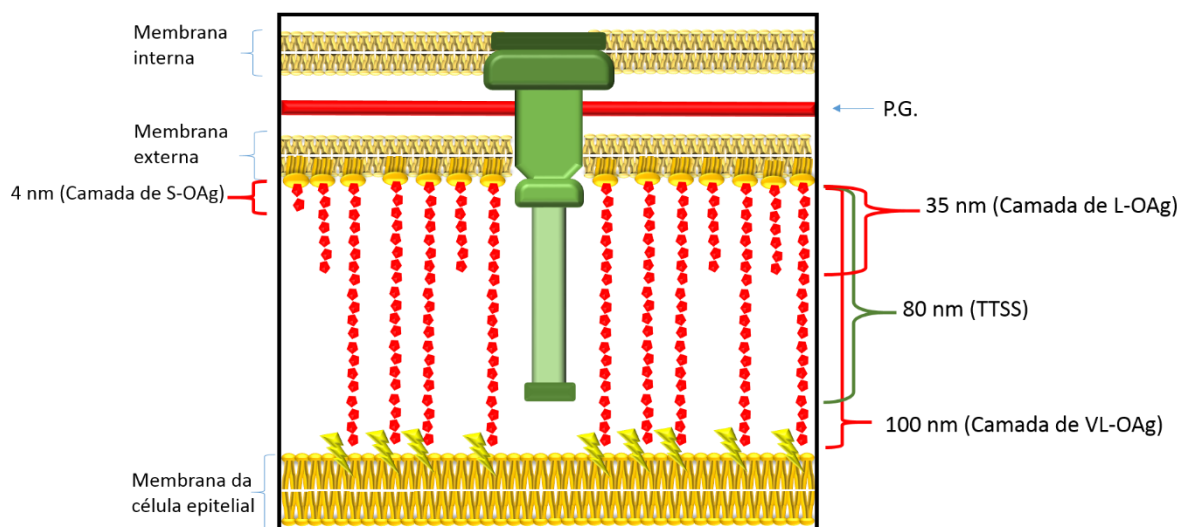


Fig. 21 - Esquema mostrando como as formas muito longas do antígeno-O (100 nm de comprimento, em vermelho) poderiam impedir o TTSS (80 nm de comprimento, verde) de atingir a membrana da célula epitelial, dificultando o processo de invasão celular.

O modelo criado para demonstrar a interferência das cadeias VL-OAg no processo de invasão (Figura 21), poderia ser aplicado ao processo de sobrevivência e replicação intracelular em macrófagos, mediado pelo TTSS de SPI-2. As diferenças fenotípicas observadas no ensaio de sobrevivência intracelular em macrófagos J774 (Figuras 16) foram semelhantes aos fenótipos observados no ensaio de motilidade (Figura 12) e invasão de células epiteliais HeLa (Figura 15). A diferença observada no mutante de *visP* em relação à cepa selvagem foi de 1,2 ordem de magnitude para o processo de invasão, quanto que para o processo de sobrevivência intracelular foi de 1,0 ordem de magnitude. A diferença entre os dois processos, ambos mediados por TTSS, observada no mutante $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$ foi mais visível, com redução de 1,4 ordem de magnitude do fenótipo de invasão (Figura 15), e de 0,5 ordem de magnitude no processo de sobrevivência intracelular em macrófagos (Figura 16), ambas em relação à cepa selvagem. Possivelmente, estas diferenças observadas estejam relacionadas à expressão diferencial das cadeias de antígeno-O dentro do SCV, conforme descrito anteriormente (LAHTEENMAKI *et al.*, 2005).

Conforme os resultados resumidos na Tabela 1, na cepa $\Delta visP / \Delta wzz_{lepE}$ há ausência das formas muito longas e acentuação das formas longas definindo níveis semelhantes à cepa selvagem, por outro lado, a presença acentuada das formas muito longas na ausência das longas manteve a atenuação do mutante simples $\Delta visP$, como no caso do $\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$, considerando

que o $\Delta visP$ tem dificuldades de respostas a estresse bacteriano conforme previamente reportado (MOREIRA *et al.*, 2013), deve-se considerar a possibilidade de antígeno-O funcionar como uma proteção da célula bacteriana contra a ação de mecanismos externos (HÖLZER *et al.*, 2009). Porém, nesta condição, a eficiência dos TTSS durante a invasão pode ser reduzida na acentuação das formas muito longas ($\Delta visP / \Delta wzz_{ST}$), conforme previamente hipotetizado (HÖLZER *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Interações entre fenótipos envolvidos na patogenicidade e o comprimento da cadeia de antígeno-O em *S. Typhimurium*.

Cepa	Motilidade (Swimming)	Motilidade (Swarming)	Invasão de células epiteliais	Sobrevivência intracelular	Níveis de VL-OAg	Níveis de L-OAg
$\Delta visP$	↓↓↓	≈ WT	↓↓↓	↓↓	↑↑↑	↑↑↑
$\Delta lpxO$	≈ WT	≈ WT	≈ WT	≈ WT	≈ WT	↓
ΔWZZ_{lepE}	≈ WT	≈ WT	≈ WT	↑	↓↓↓	≈ WT
ΔWZZ_{ST}	↑	≈ WT	↑	↑	≈ WT	↓↓↓
$\Delta visP / \Delta lpxO$	≈ WT	≈ WT	≈ WT	≈ WT	≈ WT	≈ WT
$\Delta visP / \Delta WZZ_{lepE}$	≈ WT	≈ WT	≈ WT	≈ WT	↓↓↓	↑↑↑
$\Delta visP / \Delta WZZ_{ST}$	↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓	↑↑↑	↓↓↓
↑	Pouco acentuado			↓	Pouco reduzido	
↑↑	Acentuado			↓↓	Reduzido	
↑↑↑	Muito acentuado			↓↓↓	Muito reduzido	
≈ WT	Níveis semelhantes aos da cepa selvagem					

Tabela 1 - Interações entre fenótipos envolvidos na patogenicidade e o comprimento da cadeia de antígeno-O em *S. Typhimurium*.

Segundo ilustrado como resultados preliminares, o mutante $\Delta visP$ acentua as formas muito longas e longas de antígeno-O (Figura 10). As modificações fenotípicas da deleção do gene wzz_{lepE} no mutante de $visP$ somado ao seu perfil de antígeno-O (Figura 10), demonstram uma associação das cadeias muito longas de antígeno-O (VL-OAg) com a virulência, relação esta que não foi observado com as formas intermediárias ou cadeias longas (L-OAg), devido a não complementação fenotípica de Δwzz_{ST} no mutante $\Delta visP$.

5. Conclusões

As proteínas Wzz_{sepE} e LpxO apresentaram uma evidente participação nos processos de motilidade, invasão celular e sobrevivência intracelular via VisP, sendo que o fenótipo do mutante de *visP* apresenta uma redução na sua capacidade nesses processos comparado com o tipo selvagem, e o duplos mutantes $\Delta visP / \Delta wzz_{sepE}$ e $\Delta visP / \Delta lpxO$ apresentaram uma elevação em relação a este mutante de *visP*, recuperando os níveis da amostra selvagem. Considerando que o mutante $\Delta visP$ aumenta os níveis das formas longas e muito longas de antígeno-O (Figura 9), e a conseguinte deleção de *wzz_{sepE}*, responsável pela formação da forma muito longa (Figura 6), recupera a atividade nos processos de patogênicos de invasão e sobrevivência intracelular, possivelmente o antígeno-O de comprimento muito longo (VL-Oag) apresenta um papel de inibição nestes processos. Onde ainda pode-se hipotetizar que de fato as formas muito longas de antígeno-O mediadas por Wzz_{sepE} são as responsáveis por restaurar o fenótipo patogênico no mutante $\Delta visP$, comparativamente à amostra selvagem.

Foi evidenciado também, que VisP desempenha um papel importante na montagem das cadeias de antígeno-O, e nos processos patogênicos, sendo que estas duas características possam estar interligadas através das cadeias muito longas do antígeno-O do LPS, conforme hipotetizado.

A compreensão destes mecanismos de homeostase de membrana bacteriana e a relação complexa entre bactéria patogênica, microbiota e hospedeiro é um tópico essencial na patogênese microbiana.

Referências bibliográficas

- ALIX, E.; BLANC-POTARD, A. B. Peptide-assisted degradation of the Salmonella MgtC virulence factor. **Embo J** v. 27, n. 3, p. 546-57, Feb 6 2008. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601983> >.
- ANDERSON, J. K.; SMITH, T. G.; HOOVER, T. R. Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 30, Jan 2010. ISSN 0966-842X (Print)1878-4380 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.11.001> >.
- BAARS, L. et al. Defining the role of the Escherichia coli chaperone SecB using comparative proteomics. **J Biol Chem**, v. 281, n. 15, p. 10024-34, Apr 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16352602> >.
- BADER, M. W. et al. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. **Cell**, v. 122, n. 3, p. 461-72, Aug 12 2005. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.030> >.
- BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Microb Pathog**, v. 44, n. 4, p. 271-8, Apr 2008. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17997077> >.
- BERG, H. C. The rotary motor of bacterial flagella. **Annu Rev Biochem**, v. 72, p. 19-54, 2003. ISSN 0066-4154 (Print)0066-4154. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737> >.
- BLAIR, D. F.; BERG, H. C. The MotA protein of E. coli is a proton-conducting component of the flagellar motor. **Cell**, v. 60, n. 3, p. 439-49, Feb 9 1990. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- BLANC-POTARD, A. B.; GROISMAN, E. A. The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. **Embo j**, v. 16, n. 17, p. 5376-85, Sep 1 1997. ISSN 0261-4189 (Print)0261-4189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.17.5376> >.
- CHADSEY, M. S.; KARLINSEY, J. E.; HUGHES, K. T. The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates Salmonella typhimurium sigma28 RNA polymerase holoenzyme. **Genes Dev**, v. 12, n. 19, p. 3123-36, Oct 1 1998. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- CHEVANCE, F. F.; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 6, p. 455-65, Jun 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483484> >.
- CIRILLO, D. M. et al. 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. 175-88, Oct 1998. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786194> >.
- CLARKE, M. B. et al. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 27, p. 10420-5, Jul 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16803956> >.
- CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nat Chem Biol**, v. 3, n. 9, p. 541-8, Sep 2007. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17710100> >.
- DANIELS, C.; MORONA, R. Analysis of Shigella flexneri wzz (Rol) function by mutagenesis and cross-linking: wzz is able to oligomerize. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 1, p. 181-94, Oct 1999. ISSN 0950-382X (Print)0950-382x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

- DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. **J Bacteriol**, v. 181, n. 16, p. 4949-54, Aug 1999. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 12, p. 6640-5, Jun 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10829079> >.
- DELGADO, M. A.; MOUSLIM, C.; GROISMAN, E. A. The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. **Mol Microbiol**, v. 60, n. 1, p. 39-50, Apr 2006. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556219> >.
- ERHARDT, M.; DERSCH, P. Regulatory principles governing *Salmonella* and *Yersinia* virulence. **Front Microbiol**, v. 6, 2015. ISSN 1664-302X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00949> >.
- FIERER, J. et al. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophages and nonphagocytic cells. **Infect Immun**, v. 61, n. 12, p. 5231-6, Dec 1993. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225598> >.
- FINLAY, B. B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *salmonella* entry into epithelial cells. **J Cell Sci**, v. 99 (Pt 2), p. 283-96, Jun 1991. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1909337> >.
- FRIEBEL, A. 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. 34035-40, Sep 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11440999> >.
- GALÁN, J. E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. **Mol Microbiol**, v. 20, n. 2, p. 263-71, Apr 1996. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8733226> >.
- 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**, v. 86, n. 16, p. 6383-7, Aug 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548211> >.
- GARCIA VESCOVI, E.; SONCINI, F. C.; GROISMAN, E. A. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. **Cell**, v. 84, n. 1, p. 165-74, Jan 12 1996. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- GIBBONS, H. S. et al. An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of *Salmonella* lipid A. **Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 2814-25, Mar 2008. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18254598> >.
- GINALSKI, K. et al. BOF: a novel family of bacterial OB-fold proteins. **FEBS Lett**, v. 567, n. 2-3, p. 297-301, Jun 2004. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15178340> >.
- GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. **EMBO J**, v. 12, n. 10, p. 3779-87, Oct 1993. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404849> >.
- GUZMAN, L. M. et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. **J Bacteriol**, v. 177, n. 14, p. 4121-30, Jul 1995. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- HADJIFRANGISKOU, M. et al. A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v. 80, n. 6, p. 1516-29, Jun 2011. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21542868> >.

- HARDT, W. D. et al. S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 815-26, May 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630225> >.
- HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1099-103, Apr 26 2001. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35074106> >.
- HENSEL, M. et al. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 1, p. 163-74, Oct 1998. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786193> >.
- HIGASHIDE, W. et al. Involvement of SipA in modulating actin dynamics during Salmonella invasion into cultured epithelial cells. **Cell Microbiol**, v. 4, n. 6, p. 357-65, Jun 2002. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12116966> >.
- HIRANO, T. et al. Roles of FlhK and FlhB in determination of flagellar hook length in Salmonella typhimurium. **J Bacteriol**, v. 176, n. 17, p. 5439-49, Sep 1994. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. **Nature**, v. 291, n. 5812, p. 238-9, May 21 1981. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- HUGHES, D. T. et al. Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 21, p. 9831-6, May 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457895> >.
- HÖLZER, S. U. et al. Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in Salmonella enterica. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5458-70, Dec 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797066> >.
- ILG, K. et al. O-antigen-negative Salmonella enterica serovar Typhimurium is attenuated in intestinal colonization but elicits colitis in streptomycin-treated mice. **Infect Immun**, v. 77, n. 6, p. 2568-75, Jun 2009. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01537-08> >.
- JUÁREZ-RODRÍGUEZ, M. D.; TORRES-ESCOBAR, A.; DEMUTH, D. R. ygiW and qseBC are co-expressed in Aggregatibacter actinomycetemcomitans and regulate biofilm growth. **Microbiology**, v. 159, n. Pt 6, p. 989-1001, Jun 2013. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519160> >.
- KARLINSEY, J. E. et al. Completion of the hook-basal body complex of the Salmonella typhimurium flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. **Mol Microbiol**, v. 37, n. 5, p. 1220-31, Sep 2000. ISSN 0950-382X (Print)0950-382x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- KASTOWSKY, M.; GUTBERLET, T.; BRADACZEK, H. Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. **J Bacteriol**, v. 174, n. 14, p. 4798-806, Jul 1992. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- KHAJANCHI, B. K. et al. The two-component QseBC signalling system regulates in vitro and in vivo virulence of Aeromonas hydrophila. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 259-71, Jan 2012. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998161> >.
- KROGER, C. 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. E1277-86, May 15 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1201061109> >.
- KUBORI, T. et al. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. **Science**, v. 280, n. 5363, p. 602-5, Apr 24 1998. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KUTSUKAKE, K. Excretion of the anti-sigma factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. **Mol Gen Genet**, v. 243, n. 6, p. 605-12, Jun 15 1994. ISSN 0026-8925 (Print)0026-8925. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LAHTENMAKI, K. et al. Antiprotease inactivation by *Salmonella enterica* released from infected macrophages. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 529-38, Apr 2005. ISSN 1462-5814 (Print)1462-5814. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00483.x> >.

LEE, J. et al. Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 2088-102, Jun 2010. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919618> >.

MARSHALL, J. M.; GUNN, J. S. The O-Antigen Capsule of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Facilitates Serum Resistance and Surface Expression of *FliC*. **Infect Immun**, v. 83, n. 10, p. 3946-59, Oct 2015. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00634-15> >.

MCCLELLAND, M. et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 852-6, Oct 25 2001. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35101614> >.

MCGHIE, E. J.; HAYWARD, R. D.; KORONAKIS, V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. **EMBO J**, v. 20, n. 9, p. 2131-9, May 2001. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11331579> >.

MERIGHI, M. et al. Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 42, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236707> >.

MOKRIEVICH, A. N. et al. Biological properties and structure of the lipopolysaccharide of a vaccine strain of *Francisella tularensis* generated by inactivation of a quorum sensing system gene *qseC*. **Biochemistry (Mosc)**, v. 75, n. 4, p. 443-51, Apr 2010. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618133> >.

MOREIRA, C. G. 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. 1470-5, Jan 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302685> >.

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. 4344-53, Dec 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027532> >.

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. 914-26, Mar 2010. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028809> >.

MORGENSTEIN, R. M.; CLEMMER, K. M.; RATHER, P. N. Loss of the *waaL* O-antigen ligase prevents surface activation of the flagellar gene cascade in *Proteus mirabilis*. **J Bacteriol**, v. 192, n. 12, p. 3213-21, Jun 2010. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00196-10> >.

MURRAY, G. L.; ATTRIDGE, S. R.; MORONA, R. Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of *FepE* as a second *Wzz*. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 1395-406, Mar 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603743> >.

NJOROGE, J.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE. **Infect Immun**, v. 80, n. 2, p. 688-703, Feb 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22144490> >.

- OCHMAN, H. et al. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 15, p. 7800-4, Jul 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755556> >.
- OHLSON, M. B. et al. Structure and function of *Salmonella* SifA indicate that its interactions with SKIP, SseJ, and RhoA family GTPases induce endosomal tubulation. **Cell Host Microbe**, v. 4, n. 5, p. 434-46, Nov 2008. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996344> >.
- OHNISHI, K. et al. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. **Mol Gen Genet**, v. 221, n. 2, p. 139-47, Apr 1990. ISSN 0026-8925 (Print)0026-8925. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 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. 453-63, Nov 2006. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17074883> >.
- PFEIFER, C. G. et al. *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5690-8, Nov 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531217> >.
- PILONIETA, M. C. et al. A protein important for antimicrobial peptide resistance, YdeI/OmdA, is in the periplasm and interacts with OmpD/NmpC. **J Bacteriol**, v. 191, n. 23, p. 7243-52, Dec 2009. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767429> >.
- PROST, L. R. et al. Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. **Mol Cell**, v. 26, n. 2, p. 165-74, Apr 27 2007. ISSN 1097-2765 (Print)1097-2765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.008> >.
- PULLINGER, G. D. et al. Role of two-component sensory systems of *Salmonella enterica* serovar Dublin in the pathogenesis of systemic salmonellosis in cattle. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 10, p. 3108-22, Oct 2010. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656781> >.
- RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045108> >.
- RASKO, D. A. et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, v. 321, n. 5892, p. 1078-80, Aug 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719281> >.
- READING, N. C. 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. 2468-76, Mar 2007. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220220> >.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. London: CSHL Press, 2001.
- SHEA, J. E. et al. 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. 2593-7, Mar 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637919> >.
- SIEGELE, D. A.; HU, J. C. Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 15, p. 8168-72, Jul 22 1997. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- SIRCILI, M. P. et al. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2329-37, Apr 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039358> >.

- SNAVELY, M. D.; MILLER, C. G.; MAGUIRE, M. E. The mgtB Mg²⁺ transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. **J Biol Chem**, v. 266, n. 2, p. 815-23, Jan 15 1991. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- SONCINI, F. C. et al. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. **J Bacteriol**, v. 178, n. 17, p. 5092-9, Sep 1996. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- SPERANDIO, V. et al. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8951-6, Jul 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847292> >.
- SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Mol Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 809-21, Feb 2002. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929534> >.
- STECHER, B. et al. Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 5, p. 1166-80, May 2008. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01118.x> >.
- STECHER, B. et al. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. **Infect Immun**, v. 72, n. 7, p. 4138-50, Jul 2004. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.7.4138-4150.2004> >.
- TOCILJ, A. et al. Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length. **Nat Struct Mol Biol**, v. 15, n. 2, p. 130-8, Feb 2008. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1374> >.
- TOGUCHI, A. et al. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. **J Bacteriol**, v. 182, n. 22, p. 6308-21, Nov 2000. ISSN 0021-9193 (Print)0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An introduction**. 11th edition. Glenview: Pearson, 2013.
- UNAL, C. M. et al. QseC controls biofilm formation of non-typeable *Haemophilus influenzae* in addition to an AI-2-dependent mechanism. **Int J Med Microbiol**, v. 302, n. 6, p. 261-9, Nov 2012. ISSN 1618-0607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22954413> >.
- 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. 5445-55, Oct 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988219> >.
- WANG, S. et al. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. **J Mol Biol**, v. 355, n. 4, p. 798-808, Jan 27 2006. ISSN 0022-2836 (Print)0022-2836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.020> >.
- WANG, X. et al. QseBC controls flagellar motility, fimbrial hemagglutination and intracellular virulence in fish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 30, n. 3, p. 944-53, Mar 2011. ISSN 1095-9947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288493> >.
- WHO. *Salmonella* (non-typhoidal), Fact sheet n° 139. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>, 2013.
- WOODWARD, R. et al. In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. **Nature Chemical Biology**, v. 6, p. 418-423, 2010-04-25 2010. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <http://www.nature.com/nchembio/journal/v6/n6/abs/nchembio.351.html#compounds> >.

YANAGIHARA, S. et al. Structure and transcriptional control of the flagellar master operon of *Salmonella typhimurium*. **Genes Genet Syst**, v. 74, n. 3, p. 105-11, Jun 1999. ISSN 1341-7568 (Print)1341-7568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHAO, G. et al. O-antigen Polymerase Adopts a Distributive Mechanism for Lipopolysaccharide Biosynthesis. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, n. 9, p. 4075-81, May 2014. ISSN 0175-7598 (Print)1432-0614 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5552-7> >.

ZHOU, D. 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. 248-59, Jan 2001. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136447> >.

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. 2092-5, Mar 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092234> >.

ZHOU, X. et al. Mutation of a *Salmonella* serogroup-C1-specific gene abrogates O7-antigen biosynthesis and triggers NaCl-dependent motility deficiency. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106708, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106708> >.

CAPÍTULO 2

Multilocus Sequence Typing of *Salmonella* Typhimurium reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil

Fernanda Almeida^a; Amanda Aparecida Seribelli^a; Patrick da Silva^b, Marta Inês Cazentini Medeiros^c; Dália dos Prazeres Rodrigues^d; Cristiano Gallina Moreira^b; Marc W. Allard^e#; Juliana Pfrimer Falcão^a#

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Ribeirão Preto, SP, Brasil^a; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP – Departamento de Ciências Biológicas, Araraquara, SP, Brasil^b; Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto – Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, SP, Brasil^c; Laboratório de Enterobactérias, FIOCRUZ/Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil^d; Office of Regulatory Science, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, College Park, MD, United States of America^e

Running title: *S. Typhimurium* ST313 in Brazil

#Address correspondence to Juliana P. Falcao, jufalcao@fcfrp.usp.br and Marc W. Allard, marc.allard@fda.hhs.gov.

26 **ABSTRACT**

27 *Salmonella* Typhimurium persists as one of the leading causes of gastroenteritis
28 worldwide and has been extensively studied. Multilocus sequence typing (MLST) has
29 contributed for a better understanding of the epidemiology, evolution and genotypic
30 diversity of clinically important bacterial pathogens, allowing comparison among
31 strains isolated in different parts of the globe. The aim of this study was to genotype by
32 MLST 88 *S. Typhimurium* strains isolated from humans and food between 1983 and
33 2013 in Brazil. Seventy-six (86.4%) strains were typed as ST19, nine (10.2%) as
34 ST313, two (2.3%) as ST1921 and one (1.1%) as ST1649. Noteworthy, ST313 isolates
35 have been reported almost exclusively in sub-Saharan Africa associated with
36 bloodstream infections and mortality rates of $\geq 25\%$. Due to its clinical importance, two
37 ST313 of this study named STm44 isolated from bloodstream infection and STm47
38 isolated from feces were compared to the *S. Typhimurium* SL1344 prototype strain of
39 ST 19 to better understand its pathogenicity. STm44 and STm47 were able to invade
40 epithelial cells similarly to SL1344. However, the STm44 presented 1 order of
41 magnitude increase in intramacrophage survival (or 10 X higher), compared to both
42 STm47 and SL1344. These last two strains have presented similar levels of intracellular
43 replication. Herein, we have the first description and characterization of *S.*
44 Typhimurium strains of the highly invasive ST313 isolated in Brazil.

45

46 **Keywords:** *Salmonella* Typhimurium; Multilocus Sequence Typing; ST313;
47 pathogenicity; increased intramacrophage survival

48

49

50

51 INTRODUCTION

52 Foodborne diseases have a major impact on the economy and public health
53 worldwide. Non-typhoidal *Salmonella* (NTS) is one of the most common causes of
54 bacterial foodborne illness (1, 2). It is estimated that there are about 93.8 million cases
55 annually of gastroenteritis due to non-typhoidal *Salmonella* and 155 thousand deaths per
56 year worldwide (1).

57 The genus *Salmonella* consists of two species, *Salmonella enterica* and
58 *Salmonella bongori*. Additionally, *S. enterica* is divided into six subspecies with *S.*
59 *enterica* subsp. *enterica* being the main one related to human and animal infections (3).
60 Among more than 2,600 *Salmonella enterica* serovars, *Salmonella* Typhimurium is one
61 of the most frequently isolated serovar worldwide and in Brazil (4).

62 Molecular epidemiology studies are of great importance and can help us to better
63 understand the epidemiology and genotypic diversity of clinically important bacterial
64 pathogens. Various molecular typing techniques have been used successfully for
65 subtyping *Salmonella* serovars such as Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE),
66 Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA), Multilocus
67 Sequence Typing (MLST), among others (5-9).

68 MLST is a DNA sequencing-based subtyping method which classifies
69 *Salmonella* subtypes according to the allelic profiles of seven selected housekeeping
70 genes (10, 11). The allelic profiles of the seven housekeeping genes of each isolate will
71 result into one sequence type (ST) which can be found in *Salmonella enterica* MLST
72 database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). Among *S. Typhimurium*
73 strains isolated worldwide the ST19 has been reported as the most common ST
74 followed by ST34 and ST313 that are the second and the third most commonly found
75 STs, respectively (11).

76 Specifically, ST34 was found mainly in multidrug resistant strains isolated from
77 Asia and Europe (12, 13). Interestingly, ST313 has been reported almost exclusively in
78 isolates of sub-Saharan Africa presenting high antibiotic resistance, associated with
79 bloodstream infections and mortality rates of more than 25% (14, 15). In comparison to
80 the ST19 this ST has only one single nucleotide polymorphism (SNP) difference on
81 *purE* gene.

82 *S. Typhimurium* pathogenicity is very well described (16-18), whereas two type
83 3 secretion systems (T3SS) are responsible for epithelial cells invasion and intracellular
84 replication within the *Salmonella*-containing vacuoles (SCV), respectively encoded
85 within the *Salmonella* pathogenicity island (SPI) 1 and 2, therefore they are also known
86 as T3SS-1 (16, 17) and T3SS-2 (18). Most of these virulence features have been
87 reported for prototype strains such as the SL1344 (19) virulent in mouse (20) and calf
88 models (21). The prototype strains for *S. Typhimurium* pathogenesis, such as 14028s,
89 DT104 and SL1344, a derivative from LT2 (22), are all representatives of the
90 gastroenteritis-associated classic ST19.

91 The clinical importance of *S. Typhimurium* has been well described for the
92 ST313 in African isolates often associated with HIV infections in adults, and malaria,
93 HIV, and malnutrition in children (14, 15, 23). However, strains of this ST have not
94 been isolated and described in other parts of the world.

95 The aim of this study was to evaluate the genotypic diversity of *S. Typhimurium*
96 strains isolated from humans and food sources between 1983 and 2013 in Brazil using
97 MLST. Furthermore, the pathogenicity of some strains of ST313 was evaluated.

98
99
100

101 MATERIALS AND METHODS

102 A total of 88 *S. Typhimurium* strains isolated from humans [40] between 1983
103 and 2010 and food [48] between 1995 and 2013 from different States of Brazil were
104 studied (Table 1). Those strains were provided by two *Salmonella* spp. References
105 Laboratories in Brazil that were the Adolf Lutz Institute of Ribeirao Preto (IAL-RP) and
106 the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ).

107 The genomic DNA extraction of the 88 *S. Typhimurium* strains studied, as well
108 as the determination of their concentrations were done using the methods described by
109 Campioni and Falcão (24).

110 Whole genome sequencing (WGS) was used to predict the sequence type (ST) of
111 each isolate. Libraries were prepared using 1 ng of genomic DNA with the Nextera XT
112 kit (Illumina, San Diego, CA), and the genomes were sequenced using NextSeq
113 Illumina for 2 x 151 cycles according to the manufacturer's instructions. De novo
114 assemblies were generated from all raw sequence data. The Illumina reads were
115 assembled with SPAdes (25). The sequences of all 88 *S. Typhimurium* strains studied
116 were submitted to GenBank and the accession numbers are presented in Table 1.

117 The alleles identification of the seven housekeeping genes, *aroC*, *dnaN*, *hemD*,
118 *hisD*, *purE*, *sucA* and *thrA*, were performed using the *S. enterica* MLST scheme and the
119 corresponding ST was assessed using the Center for Genomic Epidemiology MLST
120 online (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). The diagram of genetic similarity was
121 constructed comprising the 88 *S. Typhimurium* strains of this study and all the *S.*
122 *Typhimurium* strains available in the *S. enterica* MLST database
123 (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>).

124 Furthermore, the pathogenic phenotypes of two ST313 of this study (STm44 and
125 STm47) were verified in comparison with the SL1344 prototype to better understand

126 their pathogenesis. The gentamycin protection assays were performed to measure the
127 ability of these strains to invade epithelial HeLa cells after 90 minutes of bacteria-cell
128 interaction and intramacrophage survival during 3hrs after 30 minutes bacteria-cell
129 interaction in J774 murine macrophages both employing a 100:1 MOI, as previously
130 described (26-28).

131

132 **RESULTS**

133 MLST methodology was performed for the 88 *S. Typhimurium* strains studied.
134 Seventy-six (86.4%) strains, being 44 isolated from food and 32 from humans, were
135 typed as ST19 (Table 1) according the *S. enterica* MLST scheme. Nine (10.2%) strains
136 being seven isolated from humans and two isolated from food were typed as ST313.
137 Two (2.3%) strains isolated from food were typed as ST1921 and one (1.1%) strain was
138 typed as ST1649.

139 Figure 1 shows the diagram of genetic similarity generated comprising the STs
140 of the studied strains plus 1,240 *S. Typhimurium* strains deposited in the *S. enterica*
141 MLST database assessed in March 2016. ST19 represent a clonal complex (CC) with 33
142 STs single locus variant (SLV). ST34 and ST313 can be considered central subgroups.
143 ST19 is the most prevalent, ST34 is the second most prevalent and ST313 is the third
144 most prevalent.

145 The phenotypic comparison between *S. Typhimurium* SL1344 prototype strain
146 and two depicted ST313 from our MLST study was performed to evaluate their ability
147 to invade HeLa cells and survive within J774 macrophages. These selected ST313
148 strains were able to invade epithelial cells at similar levels to *S. Typhimurium* SL1344
149 prototype strain (Fig. 2A), all 3 strains were at the same order of magnitude (1×10^6
150 CFU/cm²). The STm44 strain has presented 1 order of magnitude increase in

151 intramacrophage survival (or 10 fold higher), approximately 1×10^6 CFU/cm², compared
152 to both STm47 and SL1344. These last two have presented similar levels of intracellular
153 replication (Fig. 2B).

154

155 **DISCUSSION**

156 *Salmonella* Typhimurium persists as one of the leading causes of foodborne
157 illness throughout the world. Therefore, epidemiological and molecular typing studies
158 are important for elucidating contamination routes, improving monitoring and
159 implementing control programs (4).

160 The MLST methodology was performed for the 88 *S. Typhimurium* strains
161 studied (Table 1). Of the 88 strains studied, 76 (86.4%) strains were typed as ST19
162 (Table 1), being this the most common ST among the *S. Typhimurium* strains from
163 database isolated in different locations worldwide and also among the strains of this
164 study suggesting that those strains may have a common phylogenetic origin. The strains
165 available in the database with ST19 were isolated from humans, food, animals and the
166 environment, from all continents of the world. ST19 is the central ST of a clonal
167 complex which contains the highest number of strains and has 33 single locus variants
168 (SLVs) STs (Fig. 1). Besides, ST34 and ST313 may be considered central subgroups
169 with ST34 being the second most prevalent and ST313 the third most prevalent one
170 among the *Typhimurium* serovar (Fig.1).

171 This work documents that nine (10.2%) strains of this study, seven isolated from
172 humans and two isolated from food, were typed as ST313 (Table 1). ST313 was
173 reported as almost exclusively from isolates of sub-Saharan Africa presenting a high
174 antibiotic resistance, associated with bloodstream infections and mortality rates of more
175 than 25%, and often linked with children and adult HIV positive patients (14, 15). In

176 contrast, just one strain ST313 of this study (STm29) was resistant to ampicillin.
177 Interestingly, it can be concluded that the ST313 is not exclusive of sub-Saharan Africa
178 countries and that based on this evidence presented herein, in Brazil ST313 are less
179 resistant to antibiotics than the isolates from Africa. Also, that besides bloodstream
180 infections this ST has been isolated from feces and food in Brazil.

181 Herein, we have the first description of these highly invasive ST313 strains
182 isolated and characterized in Brazil. The comparison between ST313 and ST19 strains,
183 such as SL1344, has revealed the high virulence properties of these non-typhoidal
184 strains. Both STm44 and STm47 that were typed as ST313 have shown invasion on
185 epithelial cells comparable to SL1344 levels. The blood isolated STm44 has presented a
186 more prominent replication and survival within J774 macrophages rate than the SL1344
187 strain, approximately 1 order of magnitude. Together these *in vitro* assays indicate how
188 potentially pathogenic these strains can be to the human host. Herein both isolates were
189 as invasive as the SL1344. Recently, a study has reported an African ST313 isolate to
190 be more invasive than 14028s WT *S. Typhimurium*. The authors also pointed out that
191 ST19 *S. Typhimurium* strain SL1344 exhibits particularly high levels of SPI-1
192 expression (29), which once again reinforces the importance of the data presented here.
193 Conversely, another study has shown a less invasive phenotype on ST313 sub-Saharan
194 Africa strains than ST19 *S. Typhimurium* isolates, with less expression of *sopE2*, from
195 SPI-1, and *fliC*, which encodes for a *S. Typhimurium* flagellin (30). Although the
196 complete role of T3SS-1 on the invasion progress, or the T3SS-2 intracellular
197 replication of these ST313 infections still is unclear. The data presented here on high
198 survival rate within macrophages is an important clue on how these strains may be
199 disseminated systemically on the patient's bloodstream. Even though more studies are

200 necessary for a full clarification of the process on these ST313 isolates, particularly on
201 the survival within SCV.

202 Sun and colleagues (13) characterized 294 *S. Typhimurium* strains isolated from
203 clinical origin between 1977 and 2011 in China by MLST profile. The 294 isolates were
204 assigned to 13 Sequencing types (STs) by MLST, of which ST34 and ST19 were the
205 most common. Of the 294 strains, 209 (71.1%) strains were typed by ST34 and 69
206 (23.5%) as ST19.

207 In summary, the results obtained in this work provided new information about
208 the *S. Typhimurium* ST313 considered an ST of highly invasive strains which until now
209 was almost exclusively isolated in Africa and was reported for the first time in Brazil
210 isolated from bloodstream infection, feces and food.

211

212 **FUNDING INFORMATION**

213 The study was supported by Sao Paulo Research Foundation-FAPESP (Proc.
214 2012/19132-1), by the FDA/CFSAN research founding, and by an international
215 scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-
216 CAPES (Proc. BEX 9708/14-06 for Almeida, F.).

217

218 **REFERENCES**

- 219 1. **Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones**
220 **TF, Fazil A, Hoekstra RM, Studies ICoEDBoI.** 2010. The global burden of
221 nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* **50**:882-889.
- 222 2. **Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL,**
223 **Jones JL, Griffin PM.** 2011. Foodborne illness acquired in the United States--
224 major pathogens. *Emerg Infect Dis* **17**:7-15.

- 225 3. **Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de**
226 **Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX.** 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to
227 the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* **165**:526-530.
- 228 4. **Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB,**
229 **Wegener HC, Aarestrup FM.** 2011. Global monitoring of Salmonella serovar
230 distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections
231 Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001
232 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* **8**:887-900.
- 233 5. **Campioni F, Moratto Bergamini AM, Falcão JP.** 2012. Genetic diversity,
234 virulence genes and antimicrobial resistance of Salmonella Enteritidis isolated
235 from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiol* **32**:254-
236 264.
- 237 6. **Campioni F, Davis M, Medeiros MI, Falcão JP, Shah DH.** 2013. MLVA
238 typing reveals higher genetic homogeneity among S. Enteritidis strains isolated
239 from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American
240 strains. *Int J Food Microbiol* **162**:174-181.
- 241 7. **Almeida F, Pitondo-Silva A, Oliveira MA, Falcão JP.** 2013. Molecular
242 epidemiology and virulence markers of Salmonella Infantis isolated over 25
243 years in São Paulo State, Brazil. *Infect Genet Evol* **19**:145-151.
- 244 8. **Almeida F, Medeiros MI, Rodrigues DD, Falcao JP.** 2015. Genotypic
245 diversity, pathogenic potential and the resistance profile of Salmonella
246 Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983-2013 in Brazil.
247 *J Med Microbiol.*
- 248 9. **Almeida F, Medeiros MI, Kich JD, Falcão JP.** 2016. Virulence-associated
249 genes, antimicrobial resistance and molecular typing of Salmonella

250 Typhimurium strains isolated from swine from 2000-2012 in Brazil. J Appl
251 Microbiol.

252 10. **Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G, Achtman**
253 **M.** 2002. Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is
254 approximately 50,000 years old. Infect Genet Evol **2**:39-45.

255 11. **Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG,**
256 **Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S, Group**
257 **SEMS.** 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in
258 Salmonella enterica. PLoS Pathog **8**:e1002776.

259 12. **Wong MH, Yan M, Chan EW, Liu LZ, Kan B, Chen S.** 2013. Expansion of
260 Salmonella Typhimurium ST34 clone carrying multiple resistance determinants
261 in China. Antimicrob Agents Chemother.

262 13. **Sun J, Ke B, Huang Y, He D, Li X, Liang Z, Ke C.** 2014. The molecular
263 epidemiological characteristics and genetic diversity of salmonella typhimurium
264 in guangdong, china, 2007-2011. PLoS One **9**:e113145.

265 14. **Feasey NA, Cain AK, Msefula CL, Pickard D, Alaerts M, Aslett M, Everett**
266 **DB, Allain TJ, Dougan G, Gordon MA, Heyderman RS, Kingsley RA.** 2014.
267 Drug resistance in Salmonella enterica ser. Typhimurium bloodstream infection,
268 Malawi. Emerg Infect Dis **20**:1957-1959.

269 15. **Ley B, Le Hello S, Lunguya O, Lejon V, Muyembe JJ, Weill FX, Jacobs J.**
270 2014. Invasive Salmonella enterica serotype typhimurium infections,
271 Democratic Republic of the Congo, 2007-2011. Emerg Infect Dis **20**:701-704.

272 16. **Galán JE, Curtiss R.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes
273 whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells.
274 Proc Natl Acad Sci U S A **86**:6383-6387.

- 275 17. **Galán JE.** 1996. Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells.
276 Mol Microbiol **20**:263-271.
- 277 18. **Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW.** 1996. Identification of a
278 virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella
279 typhimurium. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:2593-2597.
- 280 19. **Hoiseth SK, Stocker BA.** 1981. Aromatic-dependent Salmonella typhimurium
281 are non-virulent and effective as live vaccines. Nature **291**:238-239.
- 282 20. **Francis CL, Starnbach MN, Falkow S.** 1992. Morphological and cytoskeletal
283 changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with Salmonella
284 typhimurium grown under low-oxygen conditions. Mol Microbiol **6**:3077-3087.
- 285 21. **Wray C, Sojka WJ.** 1978. Experimental Salmonella typhimurium infection in
286 calves. Res Vet Sci **25**:139-143.
- 287 22. **McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney**
288 **L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S,**
289 **Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H,**
290 **Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK.** 2001.
291 Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2.
292 Nature **413**:852-856.
- 293 23. **Graham SM.** 2010. Nontyphoidal salmonellosis in Africa. Curr Opin Infect Dis
294 **23**:409-414.
- 295 24. **Campioni F, Falcão JP.** 2014. Genotypic diversity and virulence markers of
296 Yersinia enterocolitica biotype 1A strains isolated from clinical and non-clinical
297 origins. APMIS **122**:215-222.
- 298 25. **Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, Lapidus**
299 **A, Prjibelski AD, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R,**

300 **Clingenpeel SR, Woyke T, McLean JS, Lasken R, Tesler G, Alekseyev MA,**
301 **Pevzner PA.** 2013. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes
302 from chimeric MDA products. *J Comput Biol* **20**:714-737.

303 26. **Pfeifer CG, Marcus SL, Steele-Mortimer O, Knodler LA, Finlay BB.** 1999.
304 *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion
305 into phagocytic and nonphagocytic cells. *Infect Immun* **67**:5690-5698.

306 27. **Finlay BB, Ruschkowski S, Dedhar S.** 1991. Cytoskeletal rearrangements
307 accompanying salmonella entry into epithelial cells. *J Cell Sci* **99 (Pt 2)**:283-
308 296.

309 28. **Fierer J, Eckmann L, Fang F, Pfeifer C, Finlay BB, Guiney D.** 1993.
310 Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured
311 macrophages and nonphagocytic cells. *Infect Immun* **61**:5231-5236.

312 29. **Singletary LA, Karlinsey JE, Libby SJ, Mooney JP, Lokken KL, Tsolis RM,**
313 **Byndloss MX, Hirao LA, Gaulke CA, Crawford RW, Dandekar S, Kingsley**
314 **RA, Msefula CL, Heyderman RS, Fang FC.** 2016. Loss of Multicellular
315 Behavior in Epidemic African Nontyphoidal *Salmonella enterica* Serovar
316 Typhimurium ST313 Strain D23580. *MBio* **7**.

317 30. **Carden S, Okoro C, Dougan G, Monack D.** 2015. Non-typhoidal *Salmonella*
318 Typhimurium ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less
319 inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis.
320 *Pathog Dis* **73**.

321

1 **Table 1** Year, state and source of isolation of 88 *Salmonella* Typhimurium strains isolated from humans (43) and food (48) in Brazil.

CFSAN no.	Isolate name	GenBank accession no.	Source	Year of isolation	State	ST
CFSAN033849	STm 02	LVHB00000000	Human feces	1983	SP	19
CFSAN033850	STm 03	LVHA00000000	Human feces	1983	SP	19
CFSAN033851	STm 04	LVGZ00000000	Human feces	1983	SP	19
CFSAN033852	STm 05	LVGY00000000	Human feces	1983	SP	19
CFSAN033853	STm 06	LVGX00000000	Human feces	1983	SP	1649
CFSAN033854	STm 07	LVGW00000000	Human feces	1983	SP	19
CFSAN033855	STm 08	#N/D	Human feces	1983	SP	19
CFSAN033856	STm 09	LVGV00000000	Human feces	1984	SP	19
CFSAN033857	STm 10	LVGU00000000	Human feces	1984	SP	19
CFSAN033858	STm 11	LVGT00000000	Human feces	1984	SP	19
CFSAN033859	STm 12	LUJG00000000	Human feces	1984	SP	19
CFSAN033860	STm 13	LVGS00000000	Human feces	1984	SP	19
CFSAN033861	STm 14	LVGR00000000	Human feces	1984	SP	19
CFSAN033863	STm 16	LVGP00000000	Human feces	1985	SP	19
CFSAN033864	STm 17	LVGO00000000	Human feces	1985	SP	19
CFSAN033865	STm 18	LVGN00000000	Human feces	1985	SP	19
CFSAN033866	STm 19	LVGM00000000	Human feces	1986	SP	19
CFSAN033867	STm 20	LVGL00000000	Human feces	1986	SP	19
CFSAN033868	STm 21	LUJF00000000	Human feces	1986	SP	19
CFSAN033869	STm 22	LVGK00000000	Human feces	1986	SP	19
CFSAN033870	STm 23	LVGJ00000000	Human feces	1986	SP	19
CFSAN033871	STm 24	LVGI00000000	Human feces	1986	SP	19

CFSAN033872	STm 25	LVGH00000000	Human feces	1986	SP	19
CFSAN033873	STm 26	LVGG00000000	Human feces	1986	SP	19
CFSAN033874	STm 27	LVGF00000000	Human feces	1986	SP	19
CFSAN033876	STm 29	LVGE00000000	Human feces	1989	SP	313
CFSAN033877	STm 30	LVGD00000000	Human feces	1990	SP	313
CFSAN033878	STm 31	LUJD00000000	Human feces	1991	SP	19
CFSAN033879	STm 32	LVGC00000000	Human feces	1992	SP	19
CFSAN033880	STm 33	LVGB00000000	Human feces	1992	SP	19
CFSAN033881	STm 34	LVGA00000000	Human feces	1993	SP	313
CFSAN033882	STm 35	LVFZ00000000	Human feces	1995	SP	313
CFSAN033883	STm 36	LVFY00000000	Cold chicken	1995	SP	19
CFSAN033884	STm 37	LVFX00000000	Raw pork sausage	1996	SP	313
CFSAN033885	STm 38	LUJC00000000	Human feces	1997	SP	19
CFSAN033886	STm 39	LUJB00000000	Human feces	1998	SP	313
CFSAN033887	STm 40	LUJA00000000	Lettuce	1998	SP	313
CFSAN033888	STm 41	LVFW00000000	Raw kafta	1998	SP	19
CFSAN033889	STm 42	LUIZ00000000	Human feces	1999	SP	19
CFSAN033890	STm 43	LVFV00000000	Human feces	2000	SP	19
CFSAN033891	STm 44	LVFU00000000	Blood	2000	SP	313
CFSAN033892	STm 45	LUIY00000000	Raw pork sausage	2000	SP	19
CFSAN033893	STm 46	LVFT00000000	Raw tuscan sausage	2002	SP	19
CFSAN033894	STm 47	LUIX00000000	Human feces	2003	SP	313
CFSAN033895	STm 48	LUIW00000000	Brain abscess	2005	SP	19
CFSAN033896	STm 49	LVFS00000000	Human feces	2010	SP	19
CFSAN033897	702/99	LVFR00000000	Final product	1999	SC	19
CFSAN033898	12288/06	LUIV00000000	Swine	2006	SC	19

CFSAN033899	12278/06	LUIU00000000	Swine	2006	SC	19
CFSAN033900	12290/06	LUIT00000000	Swine	2006	SC	19
CFSAN033901	12268/06	LVFQ00000000	Swine	2006	SC	19
CFSAN033902	12381/06	LUIS00000000	Swine	2006	SC	19
CFSAN033903	5936/06	LUIR00000000	Cold chicken	2006	SC	19
CFSAN033904	5937/06	LUIQ00000000	Cold chicken	2006	SC	19
CFSAN033905	5934/06	LUIP00000000	Swine	2006	SC	19
CFSAN033906	5961/06	LUIO00000000	Swine	2006	SC	19
CFSAN033907	5962/06	LVFP00000000	Swine	2006	SC	19
CFSAN033908	5929/06	LUIN00000000	Poultry	2006	SC	19
CFSAN033909	13609/06	LUIM00000000	Poultry	2006	SC	19
CFSAN033910	3848/08	LUIL00000000	Food	2008	SC	19
CFSAN033911	16238/09	LUIK00000000	Ready-to-eat dish	2009	MS	19
CFSAN033912	16239/09	LVFO00000000	Ready-to-eat dish	2009	MS	19
CFSAN033913	16240/09	LUIJ00000000	Ready-to-eat dish	2009	MS	19
CFSAN033914	16202/09	LUIH00000000	Industrialized product	2009	RS	19
CFSAN033915	16251/09	LUIH00000000	Industrialized product	2009	GO	19
CFSAN033916	16273/09	LVFN00000000	Industrialized product	2009	GO	19
CFSAN033917	17307/09	LUIG00000000	Industrialized product	2009	-	19
CFSAN033918	9461/10	LUIF00000000	In natura meat	2010	SC	19
CFSAN033919	9479/10	LUIE00000000	In natura meat	2010	SC	19
CFSAN033920	7032/10	LVFM00000000	Poultry	2010	PR	19
CFSAN033921	3057/10	LUID00000000	Frozen chicken carcass	2010	PR	19
CFSAN033922	6346/10	LUIC00000000	Chicken	2010	SP	19
CFSAN033923	5635/10	LVFL00000000	Unknown	2010	RS	19
CFSAN033924	9109/10	LVFK00000000	Swine	2010	PR	19

CFSAN033925	426/10	LUIB00000000	Chicken	2010	SC	19
CFSAN033926	447/10	LUIA00000000	Chicken	2010	SC	19
CFSAN033927	2452/11	LUHZ00000000	Frozen chicken carcass	2011	SP	19
CFSAN033928	6709/11	LVFJ00000000	Cold chicken	2011	RS	19
CFSAN033929	948/12	LUHY00000000	Raw salad	2012	BA	19
CFSAN033930	1103/12	LUHX00000000	Swine (homemade salami)	2012	RS	19
CFSAN033931	1104/12	LVFI00000000	Swine (homemade salami)	2012	RS	19
CFSAN033932	3330/12	LUHW00000000	Roast beef	2012	SC	19
CFSAN033933	994/13	LUHV00000000	Final product sales (animal origin)	2013	SP	19
CFSAN033934	374/13	LUHU00000000	Final product sales (animal origin)	2013	SC	19
CFSAN033935	465/13	LUHT00000000	Final product sales (animal origin)	2013	SP	19
CFSAN033937	622/13	LUHS00000000	Final product sales (animal origin)	2013	SC	1921
CFSAN033938	583/13	LUHR00000000	Final product sales (animal origin)	2013	SC	19
CFSAN033939	623/13	LVFH00000000	Final product sales (animal origin)	2013	SC	1921

2 CFSAN, Center for Food Safety and Applied Nutrition; SP, Sao Paulo; SC, Santa Catarina; PR, Parana; MS, Mato Grosso do Sul; RS, Rio

3 Grande do Sul; GO, Goias; BA, Bahia.

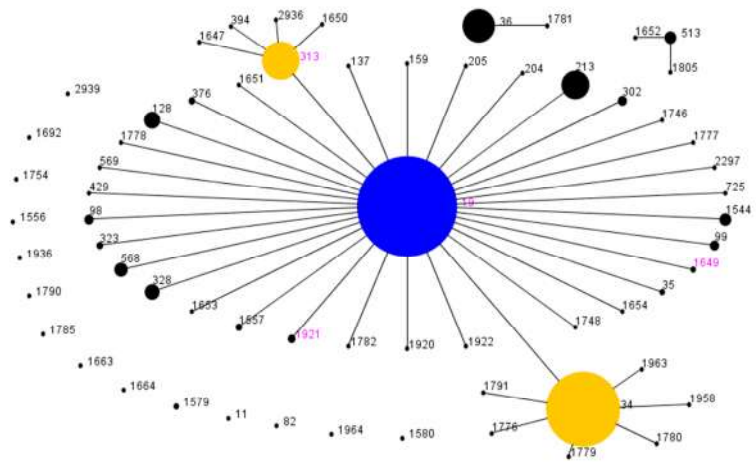


FIG 1 Diagram of genetic similarity generated by the software eBURSTv3 with the 88 *Salmonella* Typhimurium strains studied and the 1,240 *S.* Typhimurium strains available in the database.

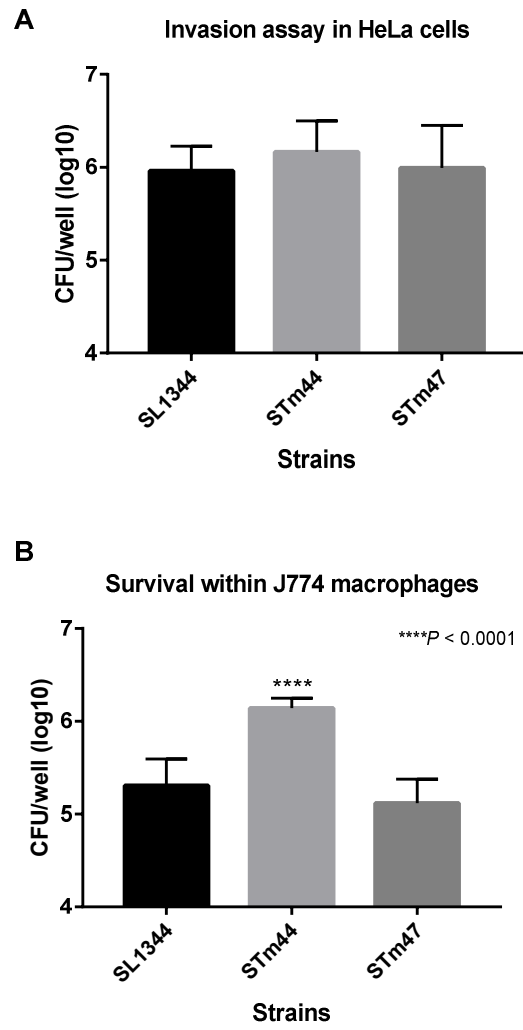


FIG 2 Comparison of the selected *Salmonella* Typhimurium strains STm44 and STm47 with the prototype SL1344 strain. (A) Invasion of HeLa cells. (B) Intramacrophage survival and replication in J774 macrophage-like cells. **** $P < 0.0001$.