

**GUILHERME MARTINES TEIXEIRA MENDES**

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE**  
*Salmonella enterica*  
**MUTANTES NOS GENES DE IHF (Integration Host Factor)**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**GUILHERME MARTINES TEIXEIRA MENDES**

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE**  
*Salmonella enterica*  
**MUTANTES NOS GENES DE IHF (Integration Host Factor)**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M522c      Mendes, Guilherme Martines Teixeira  
              Construção e caracterização de linhagens de *Salmonella enterica*  
              mutantes nos genes de IHF (Integration Host Factor) / Guilherme  
              Martines Teixeira Mendes. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Marcelo Brocchi  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Salmonella. 2. Salmonella enterica. 3. Atenuação. 4. Fator de  
Integração ao Hospedeiro. 5. Vacinas. I. Brocchi, Marcelo.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Construction and characterization of *Salmonella enterica* strains  
mutants in IHF (Integration Host Factor) genes**

**Keywords:** • Salmonella  
              • *Salmonella enterica*  
              • Attenuation  
              • Integration Host Factor  
              • Vaccine

**Titulação: Mestre em Clínica Médica**

**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Marcelo Brocchi**

**Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira**

**Prof. Dr. Mario Paulo Amante Penatti**

**Data da defesa: 29 - 02 - 2008**

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador(a): Prof Dr. MARCELO BROCCHI**

---

---

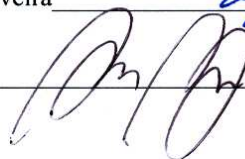
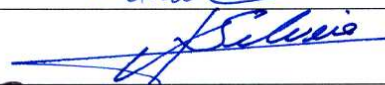
**Membros:**

---

1. Prof(a). Dr(a) .Mario Paulo Amante Penatti \_\_\_\_\_

2. Prof(a). Dr(a). Wanderley Dias da Silveira \_\_\_\_\_

3. Prof(a). Dr(a). Marcelo Brocchi \_\_\_\_\_



---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

---

**Data: 29/02/2008**

---

Este trabalho foi realizado no  
Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana,  
no Departamento de Microbiologia e Imunologia do  
Instituto de Biologia – UNICAMP.  
Contou com o apoio financeiro da  
Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço antes de tudo a Deus pela oportunidade de cada dia.

Ao meu orientador, pela confiança, amizade, ensinamentos e respeito.

Aos profs: Dr. Mario Paulo Amante Penatti, Dr. Wanderley Dias da Silveira, Dra. Clarice Weis Arns, Dra. Maria Cristina Roque Barreira, Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa, pela atenção dispensada, comentários e sugestões na correção da proforma dessa dissertação e participação na banca examinadora.

À minha família: pai, mãe e irmãos por todo o carinho, respeito, amor e companheirismo. Sem vocês mais essa etapa não teria se realizado. Não importa os mares navegados, vocês serão para sempre meu “porto seguro”. Amo vocês.

Às minhas avós, Lola e Ivete, por todo o carinho e amor. Meus sobrinhos, Ian Luca e Pedro, mesmo longe, muito amados.

Aos meus tios e tias, pelo carinho e amor. Ao meu padrinho Evaldo (*in memorian*) pelo amor, orgulho e me ensinar a ser corintiano.

À Fer, pelo amor, companheirismo e paciência, muito requerida em determinados momentos.

Aos amigos André, Bela, Dããã, Dorival, Dú, Fer, Gerson, Lu Hollanda e Lu Chimetto, obrigado pelas risadas e cervejadas. A participação de cada um foi muito importante.

Ao Marcel, Halley, Zé Raimundo e Luís, pela amizade, paciência e materiais emprestados.

A todos os animais cujas vidas foram doadas a esse trabalho.

A todos aqueles que de certa forma participaram na realização desse trabalho, mas infelizmente não foram aqui citados.

A todos vocês, meu “Muito Obrigado”

*“Nunca dominaremos completamente a natureza,  
e o nosso organismo corporal,  
ele mesmo parte dessa natureza,  
permanecerá sempre como  
uma estrutura passageira,  
com limitada capacidade de  
realização e adaptação.”*

**Dr. Sigmund Freud**

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1- Salmonella</b> .....	19
<b>1.2- S. enterica I 4,[5],12:i:- (STi)</b> .....	20
<b>1.3- Salmonelose e outras doenças</b> .....	21
<b>1.4- Salmonella e Vacinas</b> .....	22
<b>1.5 - IHF e o nucleóide bacteriano</b> .....	25
<b>1.6- O sistema de recombinação <math>\lambda</math> Red</b> .....	25
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>3.1- Meios de cultura</b> .....	30
3.1.1- Meio MEM.....	30
3.1.2- Meio LB.....	30
3.1.3- Meio LB - Agar.....	30
3.1.4- Meio SOB.....	30
3.1.5- Meio SOC.....	31
3.1.6- Meio Agar Mac Conkey.....	31
3.1.7- Meio mínimo para cultura bacteriana.....	31
3.1.8- Meio mínimo-agar.....	32
3.1.9- Antibióticos.....	32



<b>3.2- Soluções.....</b>	<b>32</b>
3.2.1- Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,01 M.....	32
3.2.2- Solução de ATV (Associação Tripsina-Versene).....	33
3.2.3- Solução Penicilina - Estreptomicina.....	33
<b>3.3- Marcador de peso molecular.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4- Termociclador e Taq DNA polimerase.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5- Linhagens bacterianas selecionadas para mutagênese.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6- Teste de sensibilidade das linhagens de <i>S. typhimurium</i> a antibióticos.....</b>	<b>34</b>
<b>3.7- Mutagênese.....</b>	<b>34</b>
3.7.1- Sistema utilizado para mutagênese.....	34
3.7.2- Extração e purificação dos plasmídeos.....	35
3.7.3- Iniciadores utilizados para gerar os cassetes de recombinação.....	35
3.7.4 - Construção do cassete de recombinação por PCR.....	36
3.7.5- Transformação das linhagens de <i>S. typhimurium</i> com o plasmídeo pKD46.....	36
3.7.6- Troca alélica dos genes <i>himA</i> e <i>himD</i> pelo cassete de recombinação.....	37
3.7.7- Eliminação do gene <i>cat</i> de resistência ao antibiótico.....	38
3.7.8- Detecção e caracterização das mutações em <i>himA</i> e <i>himD</i> por PCR.....	38
3.7.8.1- Detecção do gene <i>cat</i> .....	38
3.7.8.2- Detecção das mutações por iniciadores externos aos genes <i>himA</i> e <i>himD</i> .....	39
3.7.9- Caracterização das mutações por Sequenciamento de DNA.....	40

<b>3.8- Transdução com bacteriófago P22.....</b>	<b>40</b>
<b>3.9- Caracterização dos mutantes <i>himA</i> e <i>himD</i> de <i>S. entérica</i>.....</b>	<b>41</b>
3.9.1- Testes Fenotípicos.....	41
3.9.1.1- Curva de crescimento <i>in vitro</i> .....	41
3.9.1.2- Resistência das linhagens transformantes a Reativos Intermediários do Nitrogênio.....	41
3.9.1.3- Resistência das linhagens transformantes a Reativos Intermediários do Oxigênio.....	42
3.9.1.4- Sobrevivência em Fase Estacionária de Crescimento.....	42
3.9.1.5- Teste de Motilidade.....	43
3.9.1.6- Ensaio de Sobrevivência Intra-macrofágica.....	43
3.9.1.7- Teste de adesão e invasão em células HeLa e HEp-2.....	43
3.9.1.7.1- Preparo das linhagens bacterianas.....	43
3.9.1.7.2- Preparo das células HeLa e HEp-2.....	44
3.9.1.7.3- Adesão.....	44
3.9.1.7.4- Invasão de células HeLa e HEp-2.....	44
3.9.1.8- Determinação da Dose Letal (DL <sub>50</sub> ) intraperitonal em camundongos.....	45
3.9.1.9- Desafio via inoculação intraperitonal.....	46
3.9.1.10- Determinação da Dose Letal (DL <sub>50</sub> ) por via oral em camundongos.....	46
3.9.1.11- Desafio via oral.....	47
3.9.2- Testes Genotípicos.....	47
3.9.2.1- Detecção da presença de genes de virulência em <i>S. entérica</i> .....	47

<b>4- RESULTADOS</b> .....	49
<b>4.1- Seleção e características biológicas das linhagens de <i>Salmonella entérica</i></b> .....	50
<b>4.2- Mutagênese e caracterização das mutações</b> .....	50
4.2.1- Extração e purificação dos plasmídios.....	50
4.2.2- Construção do cassete de recombinação por PCR.....	50
4.2.3- Construção das linhagens mutantes <i>himA</i> e <i>himD</i> de <i>S. entérica</i> .....	51
4.2.4- Caracterização da mutagênese em <i>himA</i> e <i>himD</i> .....	52
4.2.5- PCR para detecção do gene <i>cat</i> .....	52
4.2.6- Detecção dos cassetes de recombinação nas amostras recombinantes.....	53
4.2.7- Seqüenciamento de DNA e montagem de <i>contigs</i> .....	55
<b>4.3- Caracterização das linhagens recombinates</b> .....	56
4.3.1- Caracterização fenotípica.....	56
4.3.1.1- Curva de crescimento <i>in vitro</i> .....	56
4.3.1.2- Resistência dos mutantes a Reativos Intermediários do Nitrogênio (RNI).....	58
4.3.1.3- Resistência a Reativos Intermediários do Oxigênio (ROI).....	60
4.3.1.4- Sobrevivência em Fase Estacionária de Crescimento.....	62
4.3.1.5- Teste de Motilidade.....	62
4.3.1.6- Ensaio de Invasão e Sobrevivência em Macrófagos.....	64
4.3.1.7- Teste de adesão e invasão em células HeLa e HEP-2.....	66
4.3.1.7.1- Adesão.....	66
4.3.1.7.2- Invasão de células HeLa e HEP-2.....	66
4.3.2- Caracterização genotípica: Detecção da presença de genes de virulência em <i>S. entérica</i> .....	69

<b>4.4- Atenuação e proteção no modelo murino.....</b>	<b>69</b>
4.4.1- Determinação da Dose Letal Média (DL <sub>50</sub> ) intraperitoneal em Camundongos.....	69
4.4.2- Determinação da Dose Letal Média (DL <sub>50</sub> ) oral em Camundongos.....	69
4.4.3- Desafio com as linhagens selvagens pela via intraperitoneal.....	70
4.4.4- Desafio via oral com as linhagens selvagens.....	74
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>cat</b>	<i>Gene cloranfenicol acetil transferase</i>
<b>CDS</b>	Seqüências Codificantes
<b>DL50</b>	Dose Letal 50
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>IHF</b>	Fator de Integração ao Hospedeiro
<b>IPS</b>	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LB-ágar</b>	Luria Bertani Ágar
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Mili molar
<b>MAI</b>	<i>Moving Average Interpolation</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>N</b>	Normal
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NSA</b>	Nitrito de Sódio em meio Acidificado
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Tampão Salina Fosfato

<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PMN</b>	Polimorfonuclear
<b>ST</b>	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium
<b>STi</b>	<i>Salmonella enterica</i> I 4, [5], 12:i:-
<b>TBE</b>	Tris Borato EDTA
<b>TLR</b>	<i>Toll Like Receptor</i>
<b>RNI</b>	Reativos Intermediários do Nitrogênio
<b>ROI</b>	Reativos Intermediários do Oxigênio
<b>CFU</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>V</b>	Volts

## **RESUMO**

O gênero *Salmonella* spp é formado por bacilos gram-negativos, que podem ser divididos em 3 espécies: *S. enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea*. A maioria das sorovariedades patogênicas para o homem está incluída no subgrupo I da espécie *S. enterica*. A infecção por *S. enterica* inicia-se com a ingestão de água ou alimentos contaminados. Estes microrganismos são patógenos intracelulares facultativos e, uma vez ingeridos, apresentam a capacidade de aderir e invadir células da mucosa intestinal, preferencialmente células M. Uma vez ultrapassada a mucosa intestinal, *S. enterica* invade, persiste e prolifera no interior de vacúolos de células do sistema retículo endotelial podendo assim, alcançar diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro, causando infecção sistêmica.

Sendo assim, linhagens mutantes avirulentas, mas ainda capazes de causar infecção transitória, são boas candidatas a potenciais vacinas vivas orais. Tais mutantes são potenciais carreadores de proteínas heterólogas, compondo, assim, as chamadas vacinas multi-valentes. Que seja de nosso conhecimento, não existem mutantes atenuados de *S. enterica* desenvolvidos inteiramente no Brasil, havendo necessidade de pagamento de patentes a grupos estrangeiros para sua utilização.

Em eucariotos, o DNA cromossômico bacteriano está associado a proteínas (histonas) formando o núcleo, enquanto em procariotos, estas proteínas são denominadas *histona-like*, formando um nucleóide. Dentre essas proteínas podemos citar a IHF (*integration host factor*), um heterodímero que controla ou influencia vários processos celulares, como a duplicação e recombinação do DNA, além de regular positiva ou negativamente a expressão de vários genes.

Neste estudo, mutantes nulos para os genes *himA* e *himD* de IHF foram criados pela técnica de recombinação homóloga mediada pelo sistema  $\lambda$  Red (Datsenko e Wanner, 2000) e testados quanto a atenuação da virulência e capacidade de desencadear resposta imune efetiva e protetora contra a salmonelose murina. Os mutantes também foram caracterizados quanto a diversas características biológicas, como a capacidade de invasão e sobrevivência intracelular, resistência a radicais reativos de oxigênio e nitrogênio, ente outras, sendo os resultados comparados com as respectivas linhagens selvagens.

Os mutantes *himA* e *himD* de *S. enterica* foram atenuados e capazes de induzir resposta imune protetora quando desafiados com doses elevadas da linhagem selvagem, indicando que estas linhagens recombinantes são potenciais candidatas a vacinais vivas orais.



# **ABSTRACT**

The genus *Salmonella sp* is formed by gram-negative bacilli, which can be divided into 3 species: *S. enterica*, *S. bongori* and *S. subterranea*. The majority of the serovars pathogenic to humans is included in the subgroup I of the *S. enterica* species. The infection with *S. enterica* starts either the ingestion of contaminated water or food. These microorganisms are facultative intracellular pathogens and, once ingested, they have the capacity to adhere and invade cells of the intestinal mucosa, with preference for M cells. Then, *S. enterica* can invade and proliferate within vacuoles of immune cells, particularly macrophages, achieving different organs and tissues of the host, causing systemic infection.

Mutant strains of *S. enterica* with attenuation of the virulence but that are still able to cause a transient infection, are good candidates for potential live oral vaccines. These mutants are also good carriers of heterologous antigens to cells of the immunological system, been able to induce an effective immunological response. To the best of our knowledge, no mutants of this type were developed in Brazil leading to the needed to pay royalties to foreign groups for their use.

In prokaryotes the genomic DNA are associated with a number of proteins, the so called histone-like proteins, with structural and regulatory properties, forming the nucleoid. The IHF (*Integration Host Factor*) is one of the more abundant histone-like in prokaryotes. IHF is a heterodimeric DNA-binding protein that controls a number of cellular processes, such as DNA duplication and DNA recombination and also modulates the expression of different genes.

In this work we constructed recombinant strains of *S. enterica* mutants for the *himA* and *himD* genes that encode for the IHF subunits using the  $\lambda$  Red system (Datsenko and Wanner, 2000) and tested for attenuation and immunogenicity. The mutant strains were also characterized and compared to the parental strains for other biological characteristics such as the capacity to invade and proliferate into eukaryotic cells and to survive to different stress conditions.

The *S. enterica himA* and *himD* mutant strains were attenuated for virulence and able to induce a protective immunity against the wild type strain of *S. enterica* indicating that these recombinant strains are candidates to formulate a new live oral vaccine.

# **1- INTRODUÇÃO**

## 1.1- *Salmonella*

O gênero *Salmonella* spp pertence à família *Enterobacteriaceae* sendo formado por bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, geralmente flagelados (Mastroeni e Maskell, 2006). A classificação sorológica desta bactéria fundamenta-se na identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), este último quando presente. Este é um gênero altamente heterogêneo, sendo atualmente conhecidas mais de 2500 sorovariedades de *Salmonella* sp (Poppof *et al.*, 2004), definidas pelos antígenos acima citados (Kaufman, 1978).

Estudos de hibridação de DNA sugerem a existência de duas espécies de *Salmonella*: *S. enterica* e *S. bongori*. A existência de uma terceira espécie, *S. subterrânea*, foi recentemente sugerida (Shelobolina *et al.*, 2004). A espécie *S. enterica* é subdividida em 7 subgrupos, sendo que a grande maioria das sorovariedades patogênicas para o homem está incluída no subgrupo I (Boyd *et al.*, 1996).

As sorovariedades de *S. enterica* patogênicas podem causar, em mamíferos, infecções com diferentes graus de gravidade, desde gastroenterites localizadas na mucosa intestinal até infecções sistêmicas graves, dependendo da sorovariedade bacteriana e do tipo de hospedeiro envolvido (Salyers *et al.*, 2002; Mizuno *et al.*, 2007). *S. enterica* Typhimurium e Enteritidis são patógenos comuns causadores de gastroenterites em humanos, mas também podem estar associadas a infecções extra-intestinais (Salyers *et al.* 2002; Fernandes *et al.*, 2006). Em camundongos, estas duas sorovariedades podem causar um tipo de infecção muito semelhante à febre tifóide humana.

*S. enterica* Typhi é o agente causador da febre tifóide, uma infecção sistêmica grave no homem (Salyers *et al.*, 2002, Sales, 2007). *S. enterica* Choleraesuis causa infecções sistêmicas graves, principalmente em suínos, embora também possa causar infecções em humanos (Salyers *et al.*, 2002, Sales, 2007). *Salmonella enterica* Dublin é uma sorovariedade associada principalmente a bovinos. Como *S. enterica* Thyphi em humanos, a sorovariedade Dublin é sempre invasiva e pode causar gastroenterites e septicemia nesses animais (Mizuno *et al.* 2007).

## 1.2- *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi)

No Estado de São Paulo, *S. enterica* é uma das bactérias mais frequentemente associadas a casos de diarreias e/ou infecções sistêmicas em pacientes humanos (Sales, 2007). Desde 1970, amostras atípicas de *S. enterica* subespécie I têm sido isoladas em São Paulo e em outras regiões do país (Taunay *et al.*, 1996; Tavechio *et al.*, 1996; Tavechio *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2006, Sales, 2007).

Entre Janeiro de 1991 a Dezembro de 2000, estudo realizado pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo demonstrou que 8,8% dos isolados humanos e 1,6% dos isolados não humanos (principalmente de alimentos e animais) de *S. enterica* foram identificados como *S. enterica* I,4,[5],12:i:-, uma sorovariedade atípica (Tavechio *et al.*, 2004). Fernandes *et al.*(2006) demonstraram que *S. enterica* I,4,[5],12:i:- foi a terceira sorovariedade mais frequentemente isolada na última década, sendo esta predominante em crianças com idade entre 1 e 4 anos (revisado por Sales, 2007).

Algumas sorovariedades de *S. enterica*, como Typhimurium (ST), exibem a habilidade de mudar o tipo de flagelina expresso, fenômeno este denominado de variação de fase flagelar (revisado por Henderson *et al.*, 1999). *S. enterica* Typhimurium, por exemplo, expressa dois tipos de proteínas flagelares antigênicas, codificadas pelos genes *fliC* e *fljB*, que são denominadas na nomenclatura sorológica como “i” e “1,2,” respectivamente (Sales, 2007). Isso explica a denominação sorológica de *S. enterica* Typhimurium como I,4,[5],12:i:1,2. A flagelina FliC é denominada flagelina de fase 1 e a flagelina FljB de fase 2.

A função biológica da variação de fase flagelar em *S. enterica* não é completamente entendida. A variação de fase flagelar sugere uma função de escape do sistema imunológico por aumentar o repertório de antígenos expressos pela célula bacteriana (revisado por Sales, 2007), mas sua importância na patogenicidade ainda é discutível.

Embora *S. enterica* I,4,[5],12:i:- (STi) apresente características sorológicas e fisiológicas semelhantes a *S. enterica* Typhimurium (I,4,[5],12:i:1,2), a primeira não apresenta a variação de fase flagelar característica desta última. Ikeda *et al.* (2001) demonstraram que mutantes de *S. enterica* Typhimurium expressando somente o antígeno

de fase 2 (*fljB*) eram atenuados, enquanto os mutantes que expressavam apenas o antígeno de fase 1 (*fliC*) eram tão virulentos quanto a linhagem selvagem. Consistente com estes resultados, estudos *in vivo* com a linhagem selvagem sugeriram uma vantagem seletiva aos organismos que expressam FliC, demonstrando assim que a variação de fase é um mecanismo que influencia a virulência de *S. enterica* em camundongos.

### 1.3- Salmonelose e outras doenças

A Salmonelose é uma das doenças infecciosas mais frequentes tanto em humanos quanto em outros animais (Salehi *et al.* 2007). A infecção por *S. enterica* inicia-se com a ingestão de água ou alimentos contaminados, particularmente alimentos derivados de aves e suínos. Estes microrganismos são patógenos intracelulares facultativos e, uma vez ingeridos, apresentam a capacidade de aderir e invadir células da mucosa intestinal, preferencialmente células M (Jones *et al.*, 1994). Uma vez ultrapassada a mucosa intestinal, *S. enterica* invade, persiste e prolifera no interior de vacúolos de células do sistema retículo endotelial podendo assim, alcançar diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro, causando infecção sistêmica (Salyers *et al.*, 2002). Estas infecções representam, ainda hoje, um grave problema de saúde pública, devido sua alta incidência e gravidade, principalmente em áreas subdesenvolvidas do mundo, onde as condições de higiene e saneamento básico são ainda precárias (Hofer e Reis, 1994; Boyle *et al.*, 2007). Nos EUA, aproximadamente 95% das infecções causadas por *S. enterica* são de origem alimentar, correspondendo a aproximadamente 30% das mortes causadas por infecções deste tipo (Mead *et al.*, 1999).

No Brasil, a salmonelose é um problema muito sério especialmente devido a qualidade precária do saneamento básico em regiões mais pobres e falta de noções sobre higiene pessoal e com o manuseio de alimentos (Fernandes *et al.* 2006, Ghilardi *et al.*, 2006).

A gastroenterite pode ser causada por várias sorovariedades de *S. enterica*. As 5 sorovariedades mais frequentemente isoladas na última década no Brasil, particularmente no Estado de São Paulo, são Enteritidis (67%), Typhimurium (5,2%), I,4[5],12:i:- (5,1%), Typhi (4%) e Dublin (2,5%) (Fernandes *et al.*, 2006).

A dose infectante média (DI<sub>50</sub>) de *S. enterica* capaz de produzir infecções clínicas ou subclínicas em humanos está entre 10<sup>5</sup>-10<sup>10</sup> organismos ingeridos, porém a quantidade exata requerida varia de acordo com a sorovariedade de *S. enterica* e o estado imunológico do hospedeiro (revisado por Darwin e Miller, 1999). O processo infeccioso é localizado no íleo, cólon e linfonodos mesentéricos e, comumente, manifesta-se dentro de 12-72 horas após a ingestão de alimento contaminado, com o aparecimento de diarreia, vômito e dores abdominais (Santos *et al.*, 2001). A maioria dos casos de gastroenterites ocorre em crianças com menos de 10 anos de idade, e os sintomas tendem a ser mais severos neste grupo, podendo a infecção tornar-se sistêmica.

Uma importante barreira encontrada por *S. enterica* no processo infeccioso, após sua passagem pelo epitélio intestinal, são os macrófagos da submucosa (Sano *et al.*, 2007). Estes detectam e internalizam o patógeno bacteriano a fim de eliminá-lo do hospedeiro. A bactéria é capturada em vacúolos e, geralmente, morta por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, pela acidificação do vacúolo, atividades de enzimas lisossomais e peptídeos antimicrobianos, dentre outros (revisado por Sano *et al.*, 2007).

As sorovariedades de *S. enterica*, capazes de causar infecção sistêmica, invadem os macrófagos, através de macropinocitose, e então ativam mecanismos de virulência que permitem a evasão das funções microbicidas do fagócito, permitindo a sobrevivência e replicação no ambiente intracelular (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994, Sales, 2007). A migração de macrófagos infectados para outros órgãos do sistema monocítico fagocitário facilita a disseminação da bactéria no hospedeiro.

#### **1.4- *Salmonella* e Vacinas**

A busca por uma vacina efetiva contra a febre tifóide compõe um importante capítulo na história da Microbiologia. Várias estratégias e formulações vacinais foram testadas tais como bactericinas, vacinas de subunidades e linhagens vivas atenuadas (revisado por Guzman *et al.*, 2006). O antígeno capsular Vi purificado, livre ou conjugado com proteínas carreadoras é imunogênico quando administrado por via intramuscular, ou subcutânea, e tem se mostrado eficaz em alguns estudos (Guzman *et al.*, 2006; Strugnell e Wijburg, 2006). Contudo, devido a suas características e modo de administração,

é incapaz de induzir o sistema imune ao nível de mucosa (MALT, do inglês *mucosal associated lymphoid tissue*). Desta maneira, esforços foram canalizados no desenvolvimento de vacinas constituídas por linhagens vivas atenuadas, ideais para induzir resposta imune ao nível do MALT. De fato, a grande maioria dos microrganismos patogênicos inicia a infecção por colonizar ou invadir as mucosas orgânicas o que torna a ativação do MALT uma prioridade na busca de vacinas efetivas (Mollenkopf *et al.*, 2001).

A primeira vacina viva atenuada desenvolvida contra a febre tifóide é composta pela linhagem *S. enterica* Typhi Ty21a. Esta linhagem foi obtida por mutagênese química da linhagem parental Ty2 (Germanier e Fürer, 1983). Esta vacina oral é segura, mas devido a sua grande atenuação, requer várias doses para induzir imunidade, que freqüentemente é de curta duração (Guzman *et al.*, 2006). Além disso, as causas da atenuação não estão totalmente elucidadas, uma característica pouco desejável para uma linhagem vacinal. Não obstante, a linhagem Ty21a compõe a única vacina viva atenuada contra a febre tifóide licenciada para uso em humanos, comercializada com o nome de Vivitof pela Bernabiotech Ltd da Suíça.

Os resultados alcançados com a linhagem Ty21a levaram vários grupos de pesquisa em biotecnologia a construir novas linhagens vacinais de *S. enterica*, contendo deleções em genes alvo específicos que atenuaram a virulência. Adicionalmente, essas linhagens apresentam uma característica fundamental para vacinas vivas, a estabilidade da atenuação, uma vez que a mesma foi alcançada por deleção de um ou mais genes (revisado por Guzman *et al.*, 2006). Esses mutantes foram construídos inicialmente em *S. enterica* Typhimurium, devido à disponibilidade do modelo murino de infecção, sendo as mutações promissoras transferidas para linhagens de *S. enterica* Typhi, muitas vezes a própria Ty2 (revisado por Guzman *et al.*, 2006). Sendo assim, linhagens  $\Delta$ aroA,  $\Delta$ aroC,  $\Delta$ aroD de *S. enterica*, deficientes na via biossintética dos aminoácidos aromáticos (revisado por Tacket *et al.*, 1997), mutantes  $\Delta$ cya  $\Delta$ crp, incapazes de expressar adenilato ciclase e o receptor para cAMP (Tacket *et al.*, 1997), mutantes *phoP-phpQ* (Hohmann *et al.*, 1996) entre outros, foram construídos e demonstraram-se imunogênicos, apesar da atenuação da virulência. No entanto, com freqüência, testes em voluntários humanos indicaram a ocorrência de bacteremia e/ou a necessidade de várias doses para a indução de



imunidade (Guzman *et al.*, 2006; Strugnell e Wijburg, 2006). De fato, diversos estudos têm demonstrado o desafio de se ajustar o grau de atenuação da linhagem vacinal para, de um lado, não comprometer a resposta imune e de outro, ser livre de efeitos colaterais. Desta forma, apesar de todos os esforços, ainda não existe uma formulação vacinal totalmente efetiva na proteção contra a febre tifóide.

A capacidade de invadir, sobreviver e proliferar no interior de macrófagos, polimorfonucleares e células dendríticas, aliada à disponibilidade de mutantes atenuados fazem de *S. enterica* um excelente carreador de antígenos a células do sistema imune. Assim, linhagens atenuadas de *S. enterica* podem ser manipuladas geneticamente de tal forma a expressar antígenos heterólogos, construindo-se linhagens vacinais multifatoriais. Diferentes antígenos derivados de outras bactérias, vírus, fungos, e demais parasitas e mesmo de células de mamífero foram expressos em linhagens vacinais de *S. enterica*. Estas linhagens foram capazes de induzir resposta imune protetora não somente contra a Salmonelose, mas também contra o organismo doador do antígeno heterólogo (Cheminay e Hensel, 2007; Kwon *et al.*, 2007; Loessner *et al.*, 2007; Mahoney *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2006). Uma característica fundamental de tais linhagens é, além da impossibilidade de reversão da atenuação, discutida anteriormente, a capacidade de expressar o antígeno heterólogo de forma estável e em quantidades suficientes para induzir o sistema imune.

No início, a clonagem e expressão de antígenos em *S. enterica* eram alcançadas através da utilização de plasmídios carregando genes de resistência a antibióticos (Cárdenas e Clements, 1992). Alguns estudos demonstraram, no entanto, que na ausência de pressões seletivas, tais plasmídios eram instáveis e, portanto, perdidos após poucos ciclos de replicação *in vivo* (Cárdenas e Clements, 1992; Dunstan *et al.*, 2003) ou até mesmo durante o cultivo *in vitro* (Everest *et al.*, 1995).

Para resolver tais problemas, estratégias como a utilização de promotores induzidos *in vivo* no controle de expressão do antígeno (Cheminay e Hensel, 2007; Marshall *et al.*, 2000), construção de sistemas letais balanceados (Curtiss *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995), ou a integração do gene heterólogo no cromossomo de *S. enterica* (Hone *et al.*, 1988; Strugnell *et al.*, 1990; Everest *et al.*, 1995) foram descritos.

## 1.5- IHF e o nucleóide bacteriano

Bactérias contêm proteínas do tipo *histona-like* que compõem o nucleóide bacteriano juntamente com o DNA cromossômico. Diferente das histonas de eucariotos, as “histonas” bacterianas parecem não formar com o DNA complexos análogos aos nucleossomas (Thanbichler *et al.*, 2005). Dentro deste grupo encontram-se 12 proteínas bacterianas que foram descritas como *histone-like* ou *nucleoid-associated* (Mangan *et al.*, 2006). Dentre as proteínas desta categoria, as mais bem estudadas são HU, FIS, IHF, HNS e DPS (Drlica, 1997; Mangan *et al.*, 2006, Cróinín e Dorman *et al.*, 2007).

A proteína IHF é um heterodímero sendo composta pelas subunidades  $\alpha$  (IHF- $\alpha$ ) e  $\beta$  (IHF- $\beta$ ), que são polipeptídios termoestáveis presentes na célula bacteriana em quantidades equimolares e codificados pelos genes *himA* e *himD*, respectivamente. A expressão de IHF é aumentada na fase estacionária do crescimento bacteriano e vários genes importantes para a sobrevivência bacteriana nesta fase estão sob o controle positivo do mesmo (Ishihama, 2000). Apesar de apresentar menor afinidade de ligação ao DNA se comparada a outras proteínas ligantes de DNA, IHF desempenha importante função biológica (Ali *et al.*, 2001). IHF impõe ao DNA curvaturas de aproximadamente 180° (Lorenz *et al.*, 1999), sendo essa habilidade capaz de induzir importantes alterações topológicas relevantes à organização do nucleóide (Thanbichler *et al.*, 2005), funcionando assim como co-fator em numerosos processos regulatórios (Goosen e van de Putte, 1995).

## 1.6- O sistema de recombinação $\lambda$ Red

Em bactérias entéricas, a obtenção de recombinantes utilizando moléculas lineares de DNA é um evento altamente raro, devido à instabilidade da molécula de DNA linear, que uma vez no interior da célula é rapidamente degradada pela atividade de nucleases (ExoV) do sistema de recombinação RecBCD. Para contornar esse problema, normalmente são usados mutantes ou condições que inibem ExoV (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001). Entretanto, essa metodologia não é muito eficiente para promover a recombinação de fragmentos de DNA gerados por PCR no genoma bacteriano (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001). Para contornar esta dificuldade, sistema baseado no uso da maquinaria de recombinação do bacteriófago  $\lambda$  (o sistema  $\lambda$  Red) foi recentemente proposto por Datsenko e Wanner (2000).

Datsenko e Wanner (2000) descreveram a construção e o emprego de um sistema baseado em  $\lambda$  *Red* na construção de linhagens mutantes de bactérias entéricas. Este sistema é composto pelo plasmídeo pKD46, e por plasmídios assessórios, utilizados na construção de cassetes de recombinação por PCR (Datsenko e Wanner. 2000).

O sistema de recombinação  $\lambda$  *Red* do bacteriófago  $\lambda$  inclui 3 genes:  $\gamma$ ,  $\beta$  e *exo* (todos presentes no plasmídeo pKD46), que codificam respectivamente Gam, Bet e Exo. Gam inibe o sistema ExoV do hospedeiro, enquanto Bet e Exo promovem a recombinação de fragmentos lineares no DNA alvo (Datsenko e Wanner. 2000). Os plasmídios assessórios contêm genes de resistência a antibióticos ( $Km^R$  ou  $Cm^R$ ) flanqueados por sítios FRT (FLP *recombinase recognition targets*), formando o módulo de recombinação. Assim, estes plasmídios são utilizados na criação do cassete de recombinação. Para a geração do cassete de recombinação, seqüências de aproximadamente 30 pb homólogas ao gene alvo são geradas nas extremidades desse módulo por PCR. Assim, o cassete de recombinação nada mais é do que o módulo flanqueado por seqüências homólogas ao gene alvo. Para a geração de mutantes, o plasmídeo pKD46 é transformado na linhagem hospedeira e os transformantes são submetidos a eletroporação com o cassete de recombinação. A expressão dos genes  $\gamma$ ,  $\beta$  e *exo* irá inibir a degradação da fita linear de DNA e permitir a recombinação do cassete a partir do reconhecimento das seqüências FRT. Esta recombinação obedece à homologia de DNA conferida pelas seqüências flanqueadores de tal forma que a recombinação irá envolver somente seqüências homólogas. Os recombinantes são então selecionados utilizando as marcas de resistências carreadas pelo módulo de recombinação. Essas construções permitem uma subsequente remoção do cassete de resistência pela FLP recombinase expressa por um gene plasmidial, no caso o plasmídeo pCP20. Desta forma, é possível construir deleções ou inserções de genes em bactérias entéricas, utilizando fragmentos de DNA lineares, gerados por PCR.

O sistema de recombinação  $\lambda$  *Red* foi utilizado com sucesso na construção de mutações em *E. coli* (Datsenko e Wanner, 2000), *Salmonella* (Ho e Slauch, 2001), *Klebsiella* (Jane *et al.*, 2001), entre outros.

## **2- OBJETIVOS**

Este trabalho teve por objetivo central a construção de mutantes nulos de *S. enterica* para os genes (*himA* e *himD*) codificadores de IHF (*Integration host factor*) com o intuito de desenvolver linhagens atenuadas quanto à virulência, mas capazes de causar infecção transitória e induzir o sistema imune de forma efetiva.

Os objetivos específicos foram: (1) avaliar a sobrevivência intracelular dos mutantes; (2) avaliar a resistência das linhagens mutantes a radicais reativos de oxigênio e nitrogênio; (3) determinar a dose letal média (DL<sub>50</sub>), estabelecendo uma comparação entre as linhagens mutantes e selvagens; (4) verificar o comportamento de mutantes *ihf* introduzidos em diferentes genótipos.

## **3- MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1- Meios de cultura e antimicrobiano.

#### 3.1.1- Meio MEM

O meio de cultura para células animais, meio MEM, foi utilizado segundo indicação fornecida pela NUTRICELL® (Campinas - SP).

#### 3.1.2- Meio Luria Bertani (LB) (Sambrook e Russell, 2001)

Triptona (Difco).....	10% (w/v)
Cloreto de Sódio(Merck).....	10% (w/v)
Extrato de Levedura (Difco).....	5% (w/v)
Água destilada/deionizada q.s.p.....	(v)

#### 3.1.3- Meio Luria Bertani - Ágar (LA)

Para o preparo do meio LB-ágar foram adicionados de 1,5 a 2% (w/v) de ágar bacteriológico (Difco®) em meio LB. Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado, em autoclave, a 121°C, durante 20 minutos.

#### 3.1.4- Meio SOB (Ausubel *et al.* 2003)

Triptona (Difco).....	2% (w/v)
Extrato de levedura (Difco).....	0,5% (w/v)
NaCl (Merck).....	10 mM
KCl (Merck).....	2,5 mM
Água destilada/deionizada q.s.p.....	(v)

Este meio foi esterilizado, por autoclavagem, conforme descrito anteriormente.

### 3.1.5- Meio SOC

Extrato de Levedura (Difco).....	0,5% (w/v)
Triptona. (Difco).....	2,0% (w/v)
NaCl (Merck).....	10 mM
KCl (Merck).....	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> (Merck).....	10 mM
MgSO <sub>4</sub> (Merck).....	10 mM
Glicose (Merck).....	20 mM
Água destilada/deionizada q.s.p.....	(v)

Este meio foi esterilizado por autoclavagem 121° C por 20 minutos.

### 3.1.6- Meio Ágar Mac Conkey

O meio de cultura utilizado foi o da formulação fornecida pela Oxoid® (Cambridge, UK).

### 3.1.7- Meio mínimo (Ausubel *et al.* 2003)

Meio M9 [5X]

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck).....	30g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck).....	15g
NH <sub>4</sub> Cl (Merck).....	5g
NaCl (Merck).....	2,5g
CaCl <sub>2</sub> (Merck).....	15mg
Água destilada/deionizada q.s.p.....	989 mL



Esta solução foi esterilizada, por autoclavagem, conforme descrito anteriormente.

Diluir os sais em água destilada/deionizada esterilizada para 1X:

Adicionar 1 mL de solução  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1M e 10 mL de solução de glicose 20%. Volume final de 1000 mL.

### 3.1.8- Meio mínimo - ágar (Ausubel *et al.* 2003)

O meio mínimo-ágar foi preparado adicionando-se 2% de ágar bacteriológico ao meio mínimo (Ausubel *et al.* 2003).

### 3.1.9- Antimicrobianos

Os antibióticos ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), kanamicina(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), estreptomina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tetraciclina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e gentamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quando requeridos, foram utilizados nas concentrações descritas em Sambrook e Russell (2001).

## 3.2- Soluções

### 3.2.1- Tampão Salina Fosfatada (PBS) 0,01 M

Cloreto de Sódio.....	8,00g
KCl.....	0,20g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,02g
$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .....	2,89g
Água destilada/deionizada..q.s.p.....	1000,00mL

Esta solução foi esterilizada, por autoclavagem, conforme descrito anteriormente.

### 3.2.2- Solução de ATV (Associação Tripsina-Versene)

A solução utilizada foi fornecida pela NUTRICELL® (Campinas-SP).

### 3.2.3- Solução Penicilina - Estreptomicina

Penicilina G Potássica.....	60.000.000 U
Estreptomicina.....	60g
Hanks 1X esterilizado.....	6000mL

A solução foi a da formulação fornecida pela NUTRICELL® (Campinas-SP).

### 3.3- Marcador de peso molecular para ácidos nucleicos

O marcador de peso molecular padrão utilizado foi o GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas®, São Paulo-SP).

### 3.4- Termociclador e Taq DNA polimerase

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas no termociclador MJ Research PTC- 200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, MA). Para minimizar a ocorrência de erros foi utilizada enzima Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen®, São Paulo-SP).

### 3.5- Linhagens bacterianas selecionadas para mutagênese

Neste estudo foram selecionadas duas linhagens selvagens de *S. enterica*, uma sorovar Typhimurium (ST662) e outra, a variante I, 4,[5],12:i.-. (STi607), que fazem parte da coleção do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular (Instituto de Biologia - UNICAMP), isoladas de pacientes com quadro clínico de salmonelose que deram entrada no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (Sales, 2007).

As amostras selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5 M, segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Por tratar-se de linhagens selvagens, a nomenclatura adotada para cada uma foi àquela designada por Sales (2002). Sendo denominadas **STi607** (variante I 4,5,12:i) e **ST662** (*S. enterica* Typhimurium).

### 3.6- Teste de sensibilidade a antimicrobianos das linhagens de *S. enterica*

Foram testadas a susceptibilidade das linhagens selecionadas para ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina. Para isso, foi utilizado o método de microdiluição conforme descrito pelo CLSI (CLSI, 2005).

### 3.7- Mutagênese

#### 3.7.1- Sistema utilizado para mutagênese

A mutagênese dos genes *himA* e *himD* foi obtida pelo sistema  $\lambda$  Red conforme descrito por Datsenko e Wanner (2000). Este sistema é constituído das linhagens e plasmídios demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1-** Linhagens bacterianas com seus respectivos plasmídios pertencentes ao sistema  $\lambda$  Red.

<b>Linhagem</b>	<b>Plasmídio</b>	<b>Referência</b>
BT340	pCP20	Datsenko e Wanner, 2000
BW25113	----	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	----	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	pKD3	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	pKD4	Datsenko e Wanner, 2000
BW25141	pKD13	Datsenko e Wanner, 2000
BW25113	pKD46	Datsenko e Wanner, 2000
BW26513	----	Datsenko e Wanner, 2000

### 3.7.2- Extração e purificação de plasmídios

Do estoque a  $-80^{\circ}\text{C}$  foi retirada uma amostra de cada cepa, descrita do item 3.7.1, contendo os plasmídios. A linhagem BW25113/pKD46 foi semeada em meio LB ágar contendo ampicilina ( $100\mu\text{g/mL}$ ); BW25141/pKD3 e BT340/pCP20 foram semeadas em meio LB ágar contendo ampicilina ( $100\mu\text{g/mL}$ ) e cloranfenicol ( $25\mu\text{g/mL}$ ); BW25141/pKD4 e BW25141/pKD13 semeadas em meio LB ágar contendo ampicilina ( $100\mu\text{g/mL}$ ) e kanamicina ( $50\mu\text{g/mL}$ ).

Foram feitas algumas modificações no protocolo sugerido pelo fabricante do kit para extração e purificação de plasmídios para a extração de pKD46 e pCP20. Para esses plasmídios, a temperatura de incubação utilizada foi  $30^{\circ}\text{C}$ , uma vez que tais plasmídios contêm origem de replicação termo-sensível. Após a extração, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Sambrook e Russell, 2001).

### 3.7.3- Iniciadores utilizados para gerar os cassetes de recombinação

Os iniciadores para essa metodologia são compostos de 2 partes contínuas, sendo a primeira uma seqüência de aproximadamente 40 bases homólogas ao gene alvo e a segunda 20 bases homólogas a uma região presente nos *plasmídios* pKD3, pKD4 e pKD13. (Datsenko e Wanner, 2001).

As regiões de homologia com o gene *himA* e *himD* foram selecionadas com base na seqüência do banco de dados do projeto Genoma *S. enterica* (NC\_003197) (Washington University, St. Louis, USA) e escolhidas de modo que fossem próximas aos códons de iniciação e terminação do gene. A região utilizada para amplificar a seqüência contida no plasmídio foi selecionada através do programa Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), baseado na seqüência do plasmídio pKD3 (AY048742) (Datsenko e Wanner, 2001). Desse modo, foram desenhados os iniciadores *himA-f*, *himA-r*, *himD-f* e *himD-r*, descritos na Tabela 2.

**Tabela 2-** Seqüência dos iniciadores utilizados para mutagênese

Iniciador	Seqüência	Referência
himA-f	5'- GCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTTGATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC - 3'	Este estudo
himA-r	5'- CGCAATACACCCTGATGGATGTTATGCCTGGATCTGATTACATATGAATATCCTCCTTAGTTC - 3'	Este estudo
himD-f	5' - CAGCCAATTTGCCTTTAAGGAACCGGAGGAATCATGACCAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC - 3'	Este estudo
himD-r	5' - TTTTTCGGGTTCAAGTTTTGCGTTAAAACTTAACCGTAAATCATATGAATATCCTCCTTAGTTC - 3'	Este estudo

Os iniciadores foram sintetizados por **Integrated DNA Technologies, Inc.**(IDT, Coralville - IA, USA) na escala de 100 nmoles.

#### 3.7.4- Construção do cassete de recombinação por PCR

Para a construção do cassete de recombinação, foram utilizados os iniciadores descritos anteriormente, para a amplificação de uma região do plasmídio pKD3. As reações foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 20 pmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA plasmidial, 1mM de cada dNTP, 2U de Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> em tampão apropriado provido com a enzima.

Para a reação de PCR, o DNA plasmidial foi desnaturado por aquecimento a 94°C por 2 minutos, e a amplificação realizada em 35 ciclos constituída dos seguintes passos: (1) desnaturaçãõ a 94°C por 30 segundos; (2) “anelamento” a 56°C por 30 segundos; (3) extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook e Russell, 2001).

#### 3.7.5- Transformação das linhagens de *S. enterica* Typhimurium com o plasmídio pKD46

A transformação das linhagens selecionadas com o plasmídio pKD46 foi realizada por eletroporação, seguindo protocolo descrito em Ausubel *et al.* (2003). O eletroporador (*Eletroporador Bio Rad. Gene Pulser II*, Hercules - CA, USA) foi ajustado para 1,5 KV, 25 µF e 200 ohms. Para tal finalidade, foram utilizadas cubetas de 0,1 cm.

Após 2 horas de incubação em meio SOC, as amostras submetidas à eletroporação foram plaqueadas em meio LB ágar provido de ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 30°C durante à noite.

Das colônias crescidas foram selecionadas três de cada linhagem, para a continuidade do experimento, sendo denominadas linhagem STi607/pKD46 e linhagem ST662/pKD46. As linhagens selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5M segundo protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001).

### 3.7.6- Troca alélica dos genes *himA* e *himD* pelo cassete de recombinação

Para a etapa de recombinação gênica foram utilizadas as linhagens STi607/pKD46 e ST662/pKD46, como descrito anteriormente, e o cassete de recombinação gerado por PCR.

O preparo das células competentes foi feito partindo-se de um pré-inóculo em tubo de polipropileno de 15 mL contendo 5 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL), que foram incubados durante à noite a 30°C sob agitação (150 rpm). Desta cultura, foram retirados 0,4 mL que foi inoculado em 40 mL de meio LB com o mesmo antibiótico, na mesma concentração e 1mM de L-arabinose (Sigma), usado como indutor da expressão dos genes  $\gamma$ ,  $\beta$ , e *exo*, sendo esta nova cultura crescida a 30°C sob agitação (150 rpm) até atingir D.O.<sub>600</sub> de 0,7. Os frascos foram resfriados em banho de gelo por 15 minutos e, então, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 5000g (4°C). O precipitado foi ressuspenso em 4 mL de água deionizada esterilizada previamente resfriada a 4°C e centrifugado novamente nas mesmas condições. Esta etapa de lavagem foi repetida 3 vezes. O sedimento formado após a última lavagem foi ressuspenso em 400 µL de glicerol 10% gelado (Sambrook e Russell, 2001) e distribuído em alíquotas de 90 µL em tubos de microcentrífuga.

Foram selecionados 3 tubos contendo as alíquotas aos quais foram adicionados 10 µL do produto gerado pela PCR; estes foram colocados em banho de gelo por 1 minuto. O eletroporador foi ajustado para 1,5 KV, 25 µF e 200 ohms e as amostras eletroporadas e

recolhidas em meio SOC, onde foram incubadas a 37°C por 2 horas e posteriormente plaqueadas em meio LB-ágar provido de cloranfenicol (25µg/mL). As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Das colônias crescidas, foi selecionada uma de cada linhagem para a continuidade do experimento, sendo denominadas linhagens STi607*himA:cat*, STi607*himD:cat*, ST662*himA:cat* e ST662*himD:cat*. As colônias selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5M segundo protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001).

Devido à sua origem de replicação termo-sensível, o plasmídio pKD46 é perdido durante o crescimento a 37°C.

### 3.7.7- Eliminação do gene *cat* de resistência ao antimicrobiano

Para a eliminação do gene de resistência ao antimicrobiano, foram utilizadas células competentes preparadas das linhagens STi607*himA:cat*, STi607*himD:cat*, ST662*himA:cat* e ST662*himD:cat*, como descrito anteriormente, e o plasmídio pCP20. A eletroporação foi feita conforme descrito anteriormente e as transformantes selecionadas em placas de LB-agar com ampicilina (100µg/mL). As placas foram incubadas durante a noite a 30°C. Das colônias crescidas foi selecionada uma de cada amostra, sendo denominadas STi607Δ*himA*, STi607Δ*himD*, ST662Δ*himA* e ST662Δ*himD*. Estas linhagens foram estocadas em glicerol 2,5M como descrito anteriormente (Sambrook e Russell, 2001).

### 3.7.8- Detecção e caracterização das mutações em *himA* e *himD* por PCR

#### 3.7.8.1- Detecção do gene *cat*

O gene *cat* (*chloramphenicol acetyl transferase*) nas mutantes de *S. enterica* foi inicialmente detectado por PCR. Foi desenhado um par de iniciadores internos a este gene, tendo-se como base a seqüência do plasmídio pKD3 (AY048742) (Datsenko e Wanner, 2001) e constituinte do cassete de recombinação. Estes foram desenhados com o software Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Estes iniciadores são mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3-** Seqüência dos iniciadores utilizados para detecção do gene *cat*

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Referência</b>
cmDT - f	5' - GAACTTCGGAATAGGAACTCA - 3'	Este estudo
cmDT - r	5' - TGTGACGGAAGATCACTTCG - 3'	Este estudo

As reações foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 20 pmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA genômico de cada transformante, 1mM de cada dNTP, 2U de Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> em tampão apropriado provido com a enzima.

Para a reação de PCR, o DNA genômico foi desnaturado por aquecimento a 94° C por 2 minutos e a amplificação realizada em 35 ciclos constituída dos seguintes passos: (1) desnaturação a 94°C por 30 segundos; (2) “anelamento” a 55°C por 30 segundos; (3) extensão a 72°C por 1 minuto. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook e Russell, 2001).

#### 3.7.8.2- Detecção das mutações por iniciadores externos aos genes *himA* e *himD*

Foram construídos dois pares de iniciadores externos aos genes *himA* e *himD* para a detecção de sua mutagênese (Tabela 4). Esses foram desenhados com o software Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), baseado na seqüência de *S. enterica* Typhimurium LT2 (NC\_003197).

**Tabela 4-** Seqüência dos iniciadores externos aos genes *himA* e *himD*

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Referência</b>
himADT - f	5'- TTGCGGAGGGTTATAAGAGC - 3'	Este estudo
himADT - r	5'- GCGTGATTTTACGGTGGGTA-3'	Este estudo
himDDT - f	5'- GTTTCGGCCTGTAATCAAGC-3'	Este estudo
himDDT - r	5'- TTTTCGGTTCGAATAGCGTTT-3'	Este estudo



### 3.7.9- Caracterização das mutações por Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de nucleotídeos foi feito utilizando o Kit *ET Terminator* e o Seqüenciador MegaBace (GE Healthcare Life Science), seguindo-se a metodologia descrita pela Rede Nacional de Seqüenciamento (BRGENE) para *Mycoplasma* sp (Vasconcelos *et al.*, 2005).

Para montagem dos *contigs* foi utilizado o programa ChromasPro versão 1.34 (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). As seqüências foram preparadas, alinhadas e comparadas entre si e com seqüências de Typhimurium depositadas no banco de dados, para verificar a ocorrência de mutações.

### 3.8- Transdução com bacteriófago P22

Este passo foi realizado uma vez que a seleção de recombinantes de *S. enterica* por eletroporação muitas vezes seleciona para linhagens contendo LPS incompletos que são mais facilmente transformáveis, mas são muito mais sensíveis ao sistema imune e incapazes de estabelecer uma infecção sistêmica em camundongos.

As linhagens STi607*himA:cat*, STi607*himD:cat*, ST662*himA:cat* e ST662*himD:cat* foram incubadas em 3 mL de meio LB com cloranfenicol (25 µg/mL) por 8 horas a 37° C, quando 1 mL de solução contendo o bacteriófago P22 (5x10<sup>6</sup> pfu/mL) foi adicionado. O inóculo com P22 foi incubado durante a noite a 37°C e agitação de 150 rpm.

No dia seguinte, a cultura foi centrifugada por 2 vezes a 10000g por 5 minutos e o sobrenadante recolhido. Ao sobrenadante foram adicionadas 3 gotas de clorofórmio. A solução foi armazenada a 4°C.

As linhagens STi607 e ST662 foram crescidas em meio LB até que atingissem D.O.<sub>600</sub> igual a 0,7 e então em 100 µL dessa cultura foram adicionados 10 µL de suspensão de P22 de tal forma que a linhagem STi607 foi incubada com partículas de P22 proveniente de culturas de STi607*himA:cat* ou STi607*himD:cat* e ST662 incubada com P22 de ST662*himA:cat* ou ST662*himD:cat*. As culturas foram, então, incubadas por 20 minutos a 37° C, para a adsorção do bacteriófago e semeadas em LB-ágar contendo cloranfenicol. Estas novas culturas foram incubadas a 37°C durante à noite.

No dia seguinte, algumas colônias foram selecionadas e testadas por PCR usando os iniciadores para detecção do gene *cat*, nas condições descritas anteriormente.

### **3.9- Caracterização dos mutantes *himA* e *himD* de *S. enterica***

#### 3.9.1- Testes Fenotípicos

##### 3.9.1.1- Curva de crescimento *in vitro*

As linhagens STi607 $\Delta$ *himA*, STi607 $\Delta$ *himD*, ST662 $\Delta$ *himA* e ST662 $\Delta$ *himD* foram inoculadas em 5 mL de meio LB e incubadas à 37° C durante a noite. No dia seguinte, 1 mL do inóculo foi adicionado a 100 mL de meio LB e a nova cultura incubada a 37°C sob agitação (150 rpm), sendo retiradas alíquotas a cada hora, durante seis horas. De cada alíquota foi medida a densidade óptica em comprimento de onda 600nm (D.O.<sub>600</sub>)

O experimento foi realizado 2 vezes e uma média desses valores calculada, sendo utilizadas no preparo de gráficos para melhor visualização e análise dos resultados.

##### 3.9.1.2- Resistência das linhagens transformantes a Reativos Intermediários do Nitrogênio

A resistência das linhagens mutagenizadas bem como das selvagens a radicais intermediários do nitrogênio foi testada pela capacidade de crescimento destas na presença de nitrito de sódio em meio acidificado (NSA), o qual gera intermediários reativos do nitrogênio, incluindo ácido nitroso e óxido nítrico (Lu *et al.*, 1999).

Para tanto, foram adicionados 20  $\mu$ L de cultura em fase estacionária em dois tubos contendo 2mL de meio LB, pH 5,0, sendo que um deles continha nitrito de sódio 20mM (Stuehr *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1927). Os isolados foram incubados a 37°C sob agitação (200rpm). Amostras dessas culturas foram coletadas nos tempos 0, 3 e 6 horas, e diluições foram plaqueadas em meio McConkey para determinação da CFU. As colônias foram contadas no dia seguinte, e a razão de sobrevivência de *S. enterica* determinada nos diferentes tempos, comparando-se com a CFU do controle sem nitrito de sódio.

### 3.9.1.3- Resistência das linhagens transformantes a Reativos Intermediários do Oxigênio

A resistência à morte pelos intermediários reativos do oxigênio (ROI) está associada com o aumento da virulência em *S. enterica* Typhimurium (De Groote *et al.*, 1996).

A resistência dos diferentes isolados a ROI foi testada pela capacidade de crescimento das amostras na presença de paraquat (N,N'-Dimethyl-4,4'- bipyridinium dichloride). Esse composto é facilmente reduzido a íons reativos gerando radicais superóxidos que reagem com lipídios não-saturados da membrana. (Sales, 2007).

As linhagens bacterianas foram inoculadas em 3 mL de meio LB e incubadas durante a noite a 37°C sob agitação (200rpm). Uma alíquota de 100µL do inóculo foi semeada em 10 mL de meio LB e a cultura incubada a 37° C sob agitação (200rpm) até atingir D.O.<sub>600</sub> igual a 0,7, quando foram feitas diluições seriadas até a quantidade de 10<sup>6</sup> bactérias/mL, que foram inoculadas em placas de meio mínimo (Sambrook e Russell, 2001). A resistência das bactérias ao peróxido de hidrogênio foi analisada conforme descrito por De Groote *et al.* (1996). Brevemente, discos de papel de filtro foram impregnados com 30µl de paraquat 1,9% e colocados no centro de placas de meio mínimo já inoculadas com as linhagens bacterianas. As culturas foram incubadas durante a noite à 37°C e os diâmetros das zonas inibitórias foram medidos em centímetros e os valores utilizados na confecção de gráficos.

### 3.9.1.4- Sobrevivência em Fase Estacionária de Crescimento

Para testar a capacidade de sobrevivência das linhagens recombinantes à falta de nutrientes, estas foram inoculados em 3mL de meio mínimo (Sambrook e Russell, 2001) e incubados a 37°C, sob agitação (200 rpm). Após 1 e 6 dias de crescimento, alíquotas foram retiradas, diluídas e plaqueadas em meio MacConkey (Oxoid, Cambridge, UK) para determinação da CFU. A razão de sobrevivência, após seis dias de incubação, foi determinada e comparada com a obtida após um dia de cultivo (Sales, 2007).

### 3.9.1.5- Teste de Motilidade

A motilidade de cada linhagem foi testada quanto à sua capacidade de crescimento e movimentação em meio semi-sólido. Para tanto, foi feito um pré-inóculo das linhagens a serem testadas e as culturas incubadas durante à noite a 37°C sob agitação (200 rpm). No dia seguinte, a quantidade de 10µL destas culturas foram inoculadas em forma de ponto, com o auxílio de uma ponteira, no centro de placas de meio LB semi-sólido (Sambrook e Russell, 2001). Estas foram incubadas a 37°C, por 24 horas, e os diâmetros das colônias medidos.

### 3.9.1.6- Ensaio de Sobrevivência Intra-macrofágica

A capacidade de *S. enterica* sobreviver e replicar em fagócitos do hospedeiro é uma característica essencial para virulência (Fields *et al.*, 1986). A sobrevivência intra-macrofágica foi medida conforme descrito por Lu *et al* (1999). Para este experimento, foram utilizados macrófagos da linhagem J774A.1, cultivados como descrito em Meringhi *et al.* (2005) e as linhagens STi607, STi607 $\Delta$ himA, STi607 $\Delta$ himD, ST662, ST662 $\Delta$ himA e ST662 $\Delta$ himD.

Amostras das monocamadas de células foram coletadas, lisadas nos tempos 0, 3 e 6 horas. Alíquotas foram plaqueadas em meio MacConkey (Oxoid) e incubadas a 37°C durante à noite. No dia seguinte, as colônias foram contadas para a determinação da CFU. Os resultados das linhagens recombinantes foram comparados às suas respectivas selvagens.

### 3.9.1.7- Teste de adesão e invasão em células HeLa e HEp-2

#### 3.9.1.7.1- Preparo das linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas mutantes construídas neste estudo, bem como as linhagens selvagens utilizadas como controles, foram semeadas em meio LB e incubadas por 18 horas a 37°C.

#### 3.9.1.7.2- Preparo das células HeLa e HEp-2

A metodologia utilizada foi a descrita por Scaletsky *et al.* (1984), com algumas modificações. As células foram cultivadas em microplacas (Falcon, USA) com 24 poços em estufa a 37°C, com atmosfera controlada de CO<sub>2</sub>, contendo 1 mL de meio MEM, em cada poço, acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (50% penicilina e 50% estreptomicina). A cada poço foi adicionada previamente uma lamínula redonda esterilizada com 13 mm de diâmetro. O crescimento das monocamadas foi acompanhado pela observação após 24 e 48 horas em microscópio invertido. A cultura foi considerada ideal para o teste quando as células apresentavam cerca de 50%, ou mais, de confluência da monocamada, e baixa refringência, sem deslocamento.

#### 3.9.1.7.3- Adesão

A metodologia utilizada foi a descrita por Nakazato (2006). Brevemente, após a formação da monocamada celular, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS esterilizado e em cada orifício foi adicionado 1,0 mL de meio Eagle contendo 2% de soro fetal bovino. Em seguida, 40 µL de meio LB contendo as linhagens crescidas por 18 horas a 37°C, foram adicionados a cada poço. A microplaca foi incubada por 3 horas a 37° C e, após este período, lavada 10 vezes com 1,0 mL de PBS 0,01 M (pH 7,4), por poço. As lamínulas foram fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com May-Grunwald (10 minutos) e Giemsa (10 minutos). Após a coloração, estas foram observadas em microscópio óptico em objetiva de imersão.

#### 3.9.1.7.4- Invasão de células HeLa e HEp-2

O ensaio da invasão em células cultivadas “*in vitro*” foi realizado como descrito por Sansonetti *et al.* (1986). As células foram cultivadas da mesma forma que a realizada no teste de adesão, porém sem as lamínulas. Um volume contendo aproximadamente 10<sup>7</sup> bactérias (determinado através da escala de Mac Farland) diluído em

caldo LB foi adicionado aos poços contendo 1 mL de meio MEM com 10% de SFB e as placas incubadas a 37°C por 90 minutos. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas 10 vezes com PBS 0,01 M (pH 7,4) acrescido de gentamicina (50 µg/mL). Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio MEM (gentamicina 50 µg/mL), em cada poço, e as placas incubadas a 37°C por uma hora. Após este período, o meio de cultura foi descartado, as células lavadas três vezes com PBS (pH 7,4). Em seguida, o tapete celular foi lavado novamente repetidas vezes, e para o descolamento e lise celular, foi adicionado 0,5 mL de deoxicolato de sódio na concentração de 0,5%. Após o descolamento, diluições seriadas foram realizadas e plaqueadas em meio MacConkey.

As placas foram incubadas a 37° C durante a noite, colônias foram contadas e os números de CFU obtidos com as linhagens mutantes comparados com os obtidos com as linhagens selvagens.

#### 3.9.1.8- Determinação da Dose Letal (DL<sub>50</sub>) intraperitoneal em camundongos

Para determinação da DL<sub>50</sub> intraperitoneal, as amostras STi607, STi607Δ*himA*, STi607Δ*himD*, ST662, ST662Δ*himA* e ST662Δ*himD* foram cultivadas em meio LB-glicose 2% a 37°C, sob agitação (200 rpm), durante à noite. No dia seguinte, 0,2mL destas culturas foram inoculados em 20mL de meio LB-glicose e incubado a 37°C sob agitação (200rpm) até que atingissem D.O.<sub>600</sub> igual a 0,7. As células foram sedimentadas por centrifugação (5000g por 5 min) e lavadas no mesmo volume de tampão salina-fosfato (PBS, pH 7,4). Este passo foi repetido uma segunda vez e o sedimento ressuspensão em PBS (0,2 mL). Diluições seriadas foram preparadas em PBS e usadas para infectar camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas. As diluições foram plaqueadas em meio McConkey-ágar (Oxoid, Cambridge, UK) para a determinação da CFU. Os camundongos foram infectados via intraperitoneal com 0,1ml das suspensões bacterianas com seringas de 1 mL e agulhas 0,45mm de diâmetro. Foram inoculadas doses que variaram, em escala logarítmica de base 10, de 10<sup>9</sup> à 10<sup>2</sup> CFU/mL, sendo utilizados três camundongos por diluição. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o inóculo.

O cálculo da DL50 foi feito com o emprego do programa MAI que utiliza o método de “*Moving Average Interpolation*” (Welkos e O’Brien, 1994).

### 3.9.1.9- Desafio via inoculação intraperitoneal

Considerando os resultados de atenuação das linhagens STi607 $\Delta$ *himA*, STi607 $\Delta$ *himD*, ST662 $\Delta$ *himA* e ST662 $\Delta$ *himD*, foram conduzidos experimentos para verificar se camundongos inoculados com doses não letais desses mutantes adquiriam resistência quando desafiados com doses letais da linhagem selvagem por via intraperitoneal. Para isso, as linhagens foram cultivadas e processadas conforme descrito anteriormente. Diluições seriadas foram preparadas em PBS e usadas para infectar camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas, como descrito anteriormente. Foram injetadas por via intraperitoneal duas doses de  $10^2$ ,  $10^3$  ou  $10^4$  CFU de cada mutante *himA* e  $10^4$ ,  $10^5$  ou  $10^6$  dos mutantes *himD*, com intervalo de 15 dias entre cada dose. Como controle, animais foram injetados com PBS. Para comparação, animais foram também inoculados com doses sub-letais ( $10^2$  e  $10^3$ ) da linhagem selvagem. Dez dias após a segunda dose, os animais foram desafiados com  $10^4$  CFU das linhagens selvagens STi607 e ST662, e a sobrevivência foi acompanhada ao longo de 30 dias de experimento. Foram utilizados três animais por tratamento.

### 3.9.1.10- Determinação da Dose Letal (DL<sub>50</sub>) por via oral em camundongos

Para determinação da DL<sub>50</sub> por via oral, as linhagens STi607 $\Delta$ *himA*, STi607 $\Delta$ *himD*, ST662 $\Delta$ *himA* e ST662 $\Delta$ *himD* foram cultivadas e processadas como descrito anteriormente na “Determinação da Dose Letal (DL<sub>50</sub>) intraperitoneal em camundongos”, porém o inóculo foi feito via oral utilizando agulha de gavagem modelo IC800 (INSIGHT, Ribeirão Preto-SP, Brasil).

A quantidade de bactérias inoculadas variou de acordo com cada grupo, sendo variáveis, em escala logarítmica de base 10, de  $10^7$  à  $10^2$  CFU/mL, sendo utilizados cinco camundongos por diluição. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o inóculo.

O cálculo da DL<sub>50</sub> foi feito com o emprego do programa MAI que utiliza o método de “*Moving Average Interpolation*” (Welkos e O’Brien, 1994).

### 3.9.1.11- Desafio via oral

A capacidade de desencadear resposta imune contra *S. enterica* foi testada em dois momentos: No primeiro, os animais foram imunizados com uma única dose de *S. enterica* e desafiados 28 dias após a mesma, sendo as doses de imunização dos mutantes para o gene *himA* iguais a  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^4$  CFU e para *himD*  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  CFU. Em um segundo experimento, animais foram imunizados oralmente com duas doses das linhagens mutantes nos dias 0 e 14 e desafiados com a linhagem selvagem no 28º dia após a primeira dose. A dose (CFU) utilizada foi de  $10^7$  para os mutantes de *himA* e  $10^8$  para *himD*, doses estas estabelecidas a partir dos resultados da  $DL_{50}$ . Os animais foram desafiados com doses de  $10^6$  CFU/mL de linhagem ST662 e  $10^7$  CFU/mL de STi607.

Para estes experimentos, foram utilizados 7 camundongos Balb/C fêmeas com 5 semanas de vida, por grupo. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o desafio e avaliados quanto à sua sobrevivência

As linhagens STi607, STi607 $\Delta$ *himA*, STi607 $\Delta$ *himD*, ST662, ST662 $\Delta$ *himA* e ST662 $\Delta$ *himD* foram cultivadas como descrito anteriormente.

### 3.9.2- Testes Genotípicos

Além da caracterização molecular das deleções em *himA* ou *himD*, as linhagens mutantes de *S. enterica* foram caracterizadas quanto a presença de alguns fatores de virulência, para descartar a ocorrência de recombinações e/ou deleções em genes importantes na patogenicidade.

#### 3.9.2.1- Detecção da presença de genes de virulência em *S. enterica*

A detecção de alguns genes de virulência de *S. enterica*, cuja PCR já está bem estabelecida na literatura, foi realizada por esta técnica. A presença dos seguintes genes de virulência foi pesquisada: de invasão (*invE/A*) e de multiplicação *in vivo* (*spvC*),



este último presente no plasmídio de virulência. Os iniciadores estão descritos na Tabela 5. Foram testadas as linhagens STi607, STi607 $\Delta$ himA, STi607 $\Delta$ himD, ST662, ST662 $\Delta$ himA e ST662 $\Delta$ himD.

**Tabela 5-** Iniciadores utilizados na detecção de alguns genes responsáveis pela patogenicidade de *S. enterica*.

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>
invE/AF	5'-TGCCTACAAGCATGAAAT GG-3'	Stone et al., 1994
invE/AR	5'-AAACTGGACCACGGTGA AA-3'	Stone et al., 1994
SpvCF	5'-ACTCCTTGACAACCAAATGCGGA-3'	Guerra et al., 2000
SpvCR	5'-TGTCTTCTGCATTTGCCACCATCA-3'	Guerra et al., 2000

## **4- RESULTADOS**

#### **4.1- Seleção e características biológicas das linhagens de *Salmonella enterica***

As linhagens de *S. enterica* selecionadas para este trabalho foram isoladas de coproculturas de pacientes apresentando sinais clínicos e sintomas de infecção (Sales, 2002). Por tratar-se de linhagens pertencentes à coleção de nosso laboratório, respeitamos a nomenclatura estabelecida por Sales (2002), que as caracterizou quanto à características de patogenicidade. Desta forma, as linhagens selecionadas foram STi607 (*S. enterica* I 4,[5],12:i:-) e ST662 (*S. enterica* Typhimurium ).

No teste de sensibilidade a antimicrobianos (CLSI, 2005) pudemos observar uma Concentração Inibitória Mínima (MIC) inferior a 10µg/mL para os antimicrobianos ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina e MIC num intervalo de 10-25 µg/mL para kanamicina, para ambas as linhagens de *S. enterica*. Este teste indicou que plasmídios com marcas de resistência a ampicilina e ao cloranfenicol poderiam ser utilizados. No entanto, os dados de MIC para kanamicina sugeriram a não utilização desta marca de resistência. Esta avaliação nos orientou na escolha da marca de resistência a ser utilizada na seleção de mutantes de *S. enterica*.

#### **4.2- Mutagênese e caracterização das mutações**

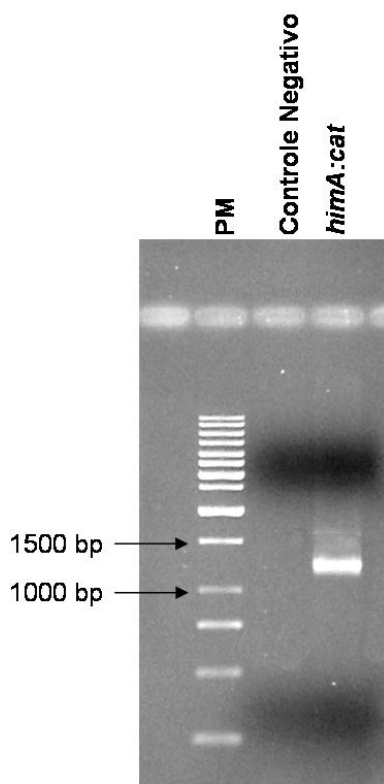
##### 4.2.1- Extração e purificação dos plasmídios

Os plasmídios pertencentes ao sistema  $\lambda$  Red foram submetidos a protocolo de extração plasmidial e o perfil avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (dados não mostrados). O perfil plasmidial observado corresponde como da literatura (Datsenko e Wanner, 2000): pCP20 (9,8 Kbp), pKD3 (2,8 Kbp), pKD4 (3,2 Kbp), pKD13 (3,4) e pKD46 (6,0 Kbp).

##### 4.2.2- Construção do cassete de recombinação por PCR

Os iniciadores *himA*-f, *himA*-r, *himD*-f e *himD*-r foram utilizados para amplificar uma região de aproximadamente 1,2 Kbp (Figura 1) do plasmídio pKD3. A região amplificada foi utilizada para compor o cassete de recombinação com os genes *himA* e *himD*, respectivamente. Por amplificarem a mesma região do plasmídio molde,

ambos os cassetes de recombinação possuem o mesmo tamanho. Desta forma, na Figura 1 está demonstrado apenas o cassete de recombinação gerado por PCR utilizando os iniciadores *himA-f* e *himA-r*.



**Figura 1-** Gel de agarose 1% mostrando o Cassete de recombinação gerado por PCR utilizando os iniciadores *himA-f* e *himA-r*. O produto de PCR utilizando os iniciadores *himD-f* e *himD-r* apresenta o mesmo perfil eletroforético e por isso não é demonstrado.

#### 4.2.3- Construção das linhagens mutantes *himA* e *himD* de *S. enterica*

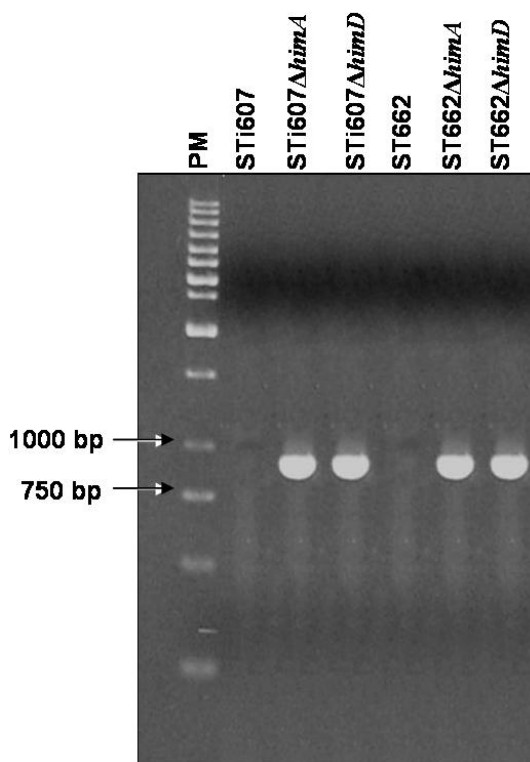
As duas linhagens de *S. enterica* foram eletroporadas com o plasmídio pKD46. A presença deste plasmídio foi avaliada pela análise do perfil plasmidial por eletroforese em gel de agarose (dados não mostrados). As linhagens foram então eletroporadas com os fragmentos lineares *himA:cat* e *himD:cat*. Clones recombinantes foram selecionados em placas de LB com cloranfenicol (25µg/mL). Os clones Cm<sup>r</sup> foram incubados a 42°C para a eliminação do plasmídio pKD46 sendo caracterizados posteriormente para a sensibilidade a ampicilina, conforme descrito em Datsenko e Wanner (2000).

#### 4.2.4- Caracterização da mutagênese em *himA* e *himD*

Após a obtenção de clones de *S. enterica* Cm<sup>r</sup>/Amp<sup>s</sup>, contendo o gene *cat* inserido no genoma, foram feitas análises moleculares no sentido de demonstrar a deleção dos genes *himA* ou *himD*.

#### 4.2.5- PCR para detecção do gene *cat*

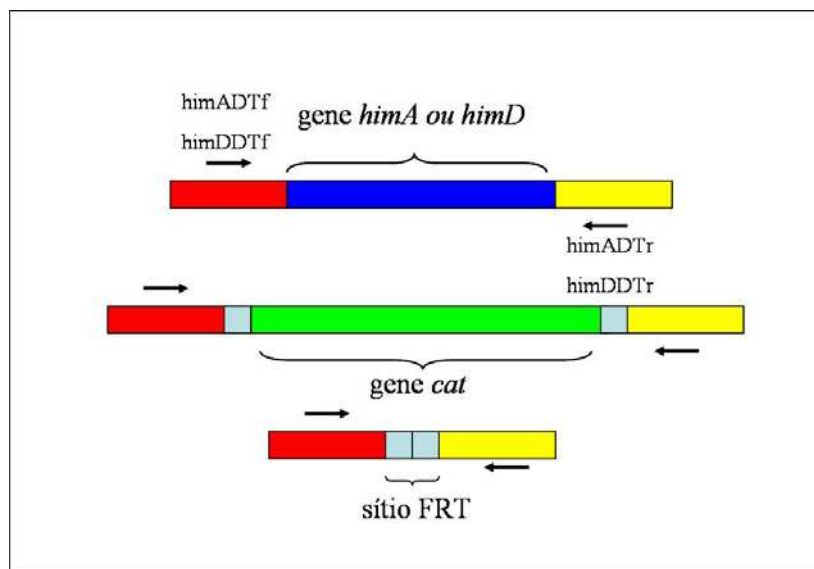
Os iniciadores cmDTf e cmDTr foram utilizados em uma análise inicial para detectar a presença do gene *cat* após a mutagênese de *himA* e *himD* em *S. enterica*. Esta PCR amplifica um fragmento de 891bp (Figura 2).



**Figura 2-** Gel de agarose 1% mostrando o produto de amplificação por PCR do gene *cat* presente em *STi607ΔhimA:cat*, *STi607ΔhimD:cat*, *ST662ΔhimA:cat*, *ST662ΔhimD:cat* com os iniciadores cmDTf e cmDTr. Observa-se que as linhagens STi607 e ST662 não apresentaram amplificação para esse gene. Todas as linhagens mutantes apresentaram o mesmo perfil eletroforético.

#### 4.2.6- Detecção dos cassetes de recombinação nas amostras recombinantes

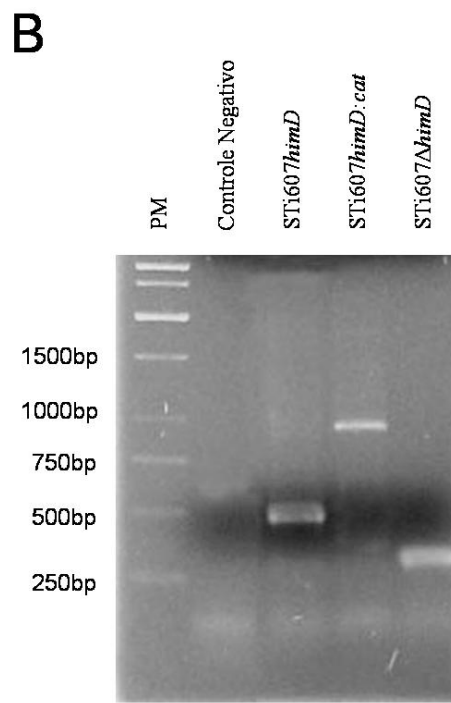
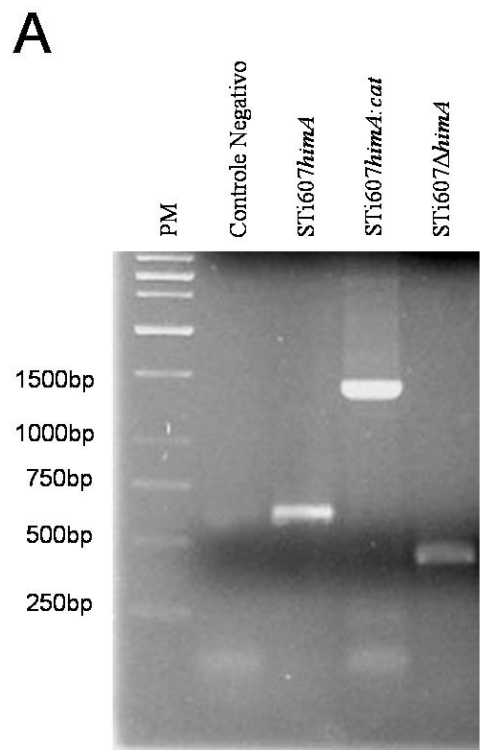
Alguns clones  $Cm^r/Amp^s$  foram avaliados por PCR utilizando iniciadores externos aos genes *himA* e *himD*, conforme o esquema da Figura 3.



**Figura 3-** Esquema demonstrando a deleção dos genes *himA* e *himD* e a posição dos iniciadores *himADTf*, *himADTr*, *himDDTf* e *himDDTr*.

Os resultados da mutagênese de *himA* e *himD* para alguns clones estão demonstrados na Figura 4. A amplificação utilizando os iniciadores *himADTf* e *himADTr* geraram fragmentos de 600 pb em *himA* selvagem, 1500pb em *himA:cat* e 300 pb em  $\Delta$ *himA* (Figura 4A). Os fragmentos gerados pelos iniciadores *himDDTf* e *himDDTr* foram de aproximadamente 480 pb para a linhagem selvagem, 1400 no mutante *himD:cat* e 200pb em  $\Delta$ *himD* (Figura 4B). Desta forma, os genes *himA* e *himD* foram mutados em ambas linhagens (607STi e 662ST), porém por apresentarem o mesmo padrão de bandas somente o produto de PCR da linhagem STi607 foi apresentado.

A remoção do cassete de resistência envolve a introdução do plasmídio pCP20 que codifica a recombinase FLP. Da mesma forma que pKD46, o plasmídio pCP20 tem origem de replicação termo-sensível e deve ser eliminado por choque térmico a 42°C (Datsenko e Wanner, 2000).



**Figura 4-** Mutagênese dos genes *himA* e *himD* nas linhagens de *S. enterica* 607STi.

**A)** Gene *himA*; **B)** Gene *himD*.

A remoção do cassete de resistência envolve a introdução do plasmídeo pCP20 que codifica a recombinase FLP. Este procedimento foi feito para 607STi. O mesmo procedimento foi utilizado para os demais mutantes. Da mesma forma que pKD46, o plasmídeo pCP20 tem origem de replicação termo-sensível e deve ser eliminado por choque térmico a 42°C (Datsenko e Wanner, 2000).

#### 4.2.7- Seqüenciamento de DNA e montagem de “contigs”

As linhagens selvagens ST662 e STi607, assim como as linhagens mutantes, foram submetidas ao seqüenciamento das regiões *himA* e *himD* para melhor caracterizar a mutagênese destes genes. O resultado do seqüenciamento está demonstrado para STi607 e STi607 $\Delta$ *himA* (Figuras 5 e 6 respectivamente). Para melhor visualização, foram destacadas em cores as regiões preservadas e removidas de *himA*. Na Figura 6 foram destacadas as localizações dos iniciadores utilizados para gerar o cassete de recombinação. As diferenças entre algumas bases das seqüências obtidas e as depositadas em bancos de dados foram devido a erros de leitura durante o sequenciamento.

```
>STi607SF well B03 Run01 Cimarron 3.12 450
CAAGAGCAAGGATTAGAGAGAAGAGAGATGCGCACGNCGCTAAAATGTGT
AGCGGCATTAAGAGAGCGATTCCAGGCATCATTGAGGGATTGAACCTATG
GCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTCGTTTGATAAGCTTGGCT
TAAGCAAGCGGGGATGGCAAAGAACTGGTTGAACTGTTTTTCGAAGAGAT
CCGTCGTGCTCTGGAAAA CGGTGAGCAGGTGAAATCCTACTGGTTTTGGT
AACTTCGATCTGCGTATAAAATCAACGTCCGGGGCGTAACCCGAACAACG
GTTGAAGATATACTATTACAGCACGGAGCCGTGGTGACCATTGACACCC
GGGACAGAAGTTACAAGAGCCGGGTCGAAAACGCTTCGCACAAAAGAAGA
GTAATCAGATCCAGGCATAAAATCCATCAGGGGTGTINATTGCGGCAGAA
TACGCTGCCAATCCCCGAAAGTTGATCAGCGGGATGACAGCTTAATATTA
TCAGCCCTGAAAAATGACCCGTATAACT
```

**Figura 5-** Locus *himA* de STi607 seqüenciado com os iniciadores *himADTf* e *himADTr*. Em amarelo a região que foi preservada e em cinza a região removida por troca alélica com o cassete de recombinação. Não confundir o esquema de cores com a deleção de *himA*. No caso da linhagem selvagem STi607, o gene *himA* está intacto.



```

>STi607ΔhimAF well D03 Run01 Cimarron 3.12 264
ACAGACCCACCGNNNTANAGAAAGAGGAGCATTGCCGCCNACGTCGTTA
AATGTGTAGAGGCATTAAGAGCGATTCCAGGCATCATTGAGGGATTCC
AACCTATGGCGCTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTGTGATA
TGTAGGCTGGAGCCTGCTTC GAAGTTCCTATACTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTAACGGAGGATATCATATGTAATCAGATCCAGGC
ATAACATCCATCAGGGTGTATTGCGGCAGATACGCTGCNTATCCCGAAAG
TAGATCAGCGGGATGACAGCGTATTTGTCAGCCTGAAAATGACCCGTATA
ACTAAAAAGGCCGCACTTGGTNCCTTTCAA

```

**Figura 6-** Locus do gene *himA* de STi607Δ*himA* seqüenciado com os iniciadores *himADTf* e *himADTr*. Em amarelo a região que foi preservada, em azul a posição do iniciador *himAf* e em verde do iniciador *himAr*. A região em vermelho corresponde aos sítios FRT presentes no cassete de recombinação. Notar a ausência da seqüência interna do gene *himA*, em cinza na Figura 5.

### 4.3- Caracterização das linhagens recombinates

#### 4.3.1- Caracterização fenotípica

Para caracterizarmos alguns fenótipos, das linhagens mutantes, associados à virulência bacteriana, realizamos uma bateria de ensaios *in vitro* e comparamos os fenótipos que poderiam contribuir para virulência *in vivo*.

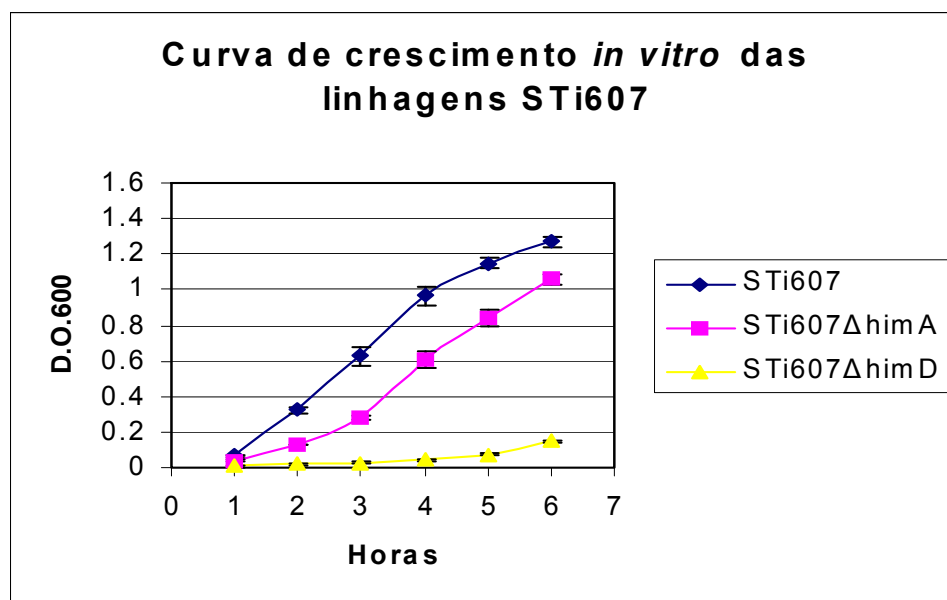
Os mutantes derivados de *S. enterica* 4,[5],12:i:- e Typhimurium foram comparados com as respectivas linhagens selvagens, utilizadas como padrão.

##### 4.3.1.1- Curva de crescimento *in vitro*

Neste ensaio de crescimento *in vitro*, alíquotas foram retiradas a cada hora, durante um período de 6 horas e a D.O.<sub>600</sub> medida. O experimento foi realizado três vezes e a média das leituras em cada hora foi avaliada em gráfico.

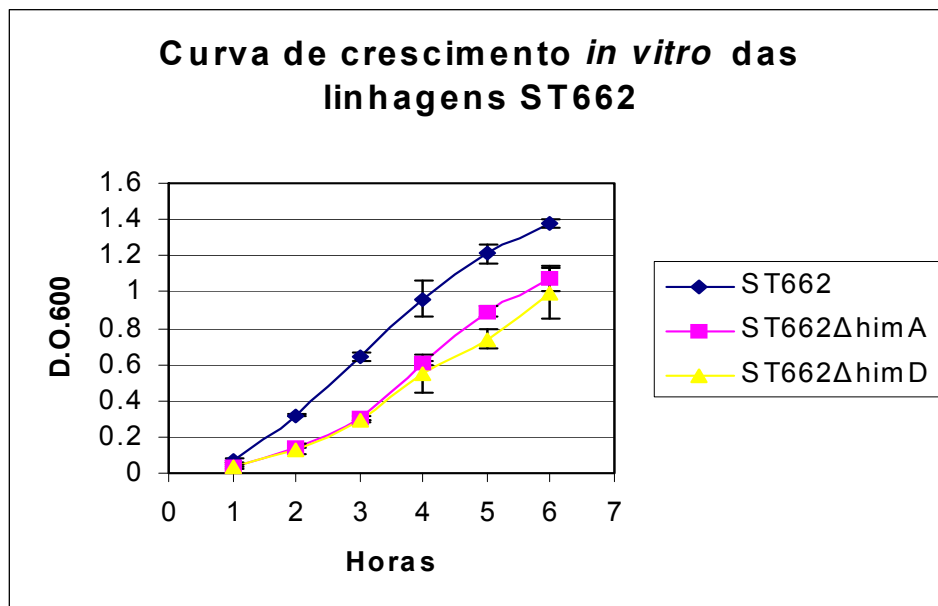
A Figura 7 representa a curva de crescimento das linhagens STi607, STi607Δ*himA* e STi607Δ*himD*. Podemos observar que a linhagem STi607Δ*himA* apresenta um crescimento um pouco mais lento que STi607 porém as diferenças foram estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ). Quando observamos o crescimento de

STi607 $\Delta$ himD em relação à selvagem, a diferença é notavelmente grande no período observado também com  $P \leq 0,05$ . Contudo, ao longo do tempo, todas as linhagens chegam à fase estacionária de crescimento. (não demonstrado no gráfico).



**Figura 7-** Curva de crescimento *in vitro* das linhagens STi607, STi607 $\Delta$ himA e STi607 $\Delta$ himD. Ambas as linhagens mutantes apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $P \leq 0,05$ ) em relação ao tempo de crescimento quando comparadas a linhagem STi607.

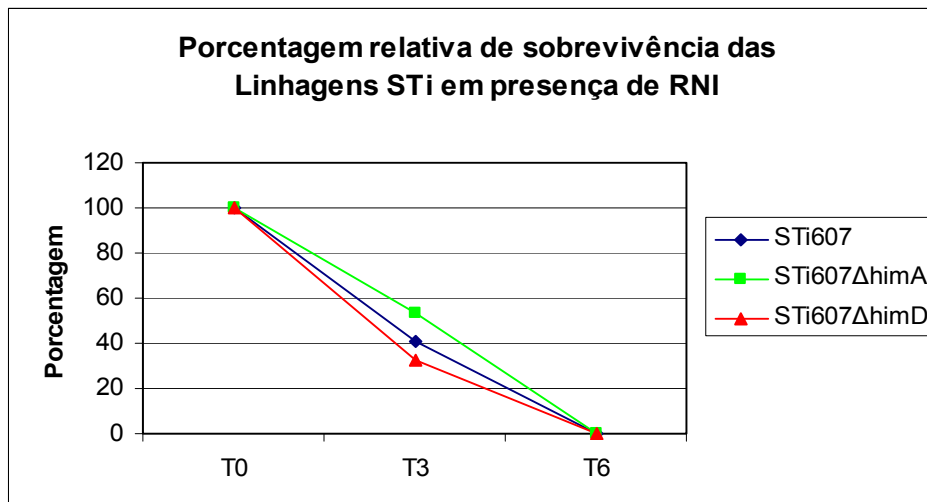
As linhagens ST662 $\Delta$ himA e ST662 $\Delta$ himD apresentam crescimento bastante parecido, porém mais lento quando comparados à linhagem selvagem ST662 (Figura 8). A diferença encontrada entre o crescimento de ST662 $\Delta$ himA e ST662 $\Delta$ himD não foi estatisticamente significativos ( $P \leq 0,05$ ), porém ambos os mutantes apresentaram significativa diferença em termos de crescimento em relação à ST662 ( $P \leq 0,05$ ), para o intervalo de crescimento analisado. Da mesma forma que observado para as linhagens selvagens e mutantes de STi607, a linhagem ST662 e os mutantes chegam à fase estacionária de crescimento (não demonstrado no gráfico).



**Figura 8-** Curva de crescimento *in vitro* das amostras ST662, ST662ΔhimA e ST662ΔhimD, demonstrando diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre o crescimento das linhagens mutantes em relação à selvagem.

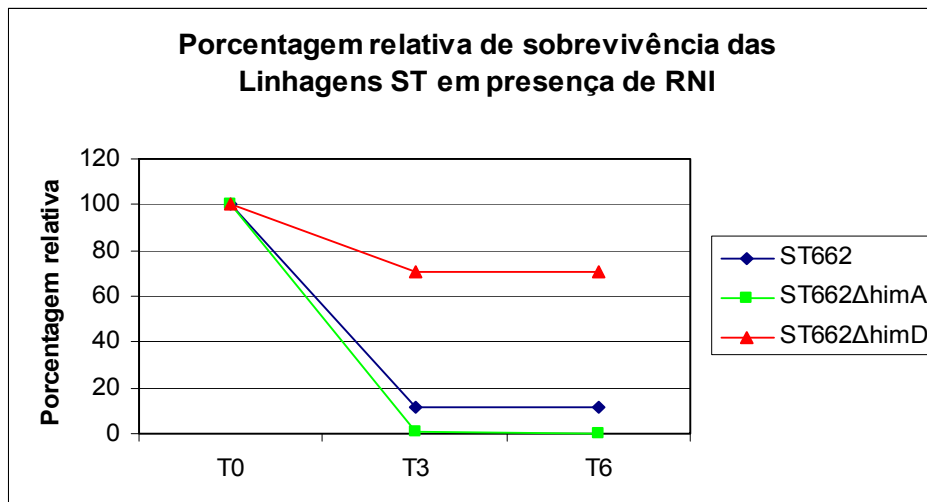
#### 4.3.1.2- Resistência dos mutantes a Reativos Intermediários do Nitrogênio (RNI)

As linhagens STi mutantes e a selvagem apresentaram sensibilidade igual aos Reativos Intermediários do Nitrogênio (RNI). Após 3 horas de cultivo na presença de NSA (Nitrito de Sódio em meio Acidificado), todas as linhagens apresentaram redução próxima de 50% no número de células quando comparado ao inóculo inicial. Após 6 horas de cultivo, todas as culturas não apresentavam células viáveis. Na Figura 9 observamos uma comparação, em termos de porcentagem relativa, o decréscimo do número de CFU ao longo do tempo. Após um período de crescimento de 6 horas não há uma diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) em termos de sobrevivência nas condições testadas entre STi607, STi607ΔhimA e STi607 ΔhimD.



**Figura 9-** Crescimento da linhagem STi607 e mutantes *himA* e *himD* nos tempos 0, 3 e 6 horas na presença de reativos intermediários de nitrogênio. Não observa-se diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre STi607 e os mutantes STi607Δ*himA* e STi607Δ*himD*.

A Figura 10 demonstra a taxa de sobrevivência das linhagens ST na presença de NSA. Neste experimento, observa-se uma diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre ST662Δ*himD* e as demais linhagens ST já em 3 horas de cultivo e persistindo ao longo do experimento. Diferença de menor magnitude também foi observada quando se compara ST662Δ*himA* com ST662. Estes dados indicam que mutantes de ST662 nulos para *himA* e particularmente *himD*, apresentam resistência aumentada a radicais reativos de nitrogênio.

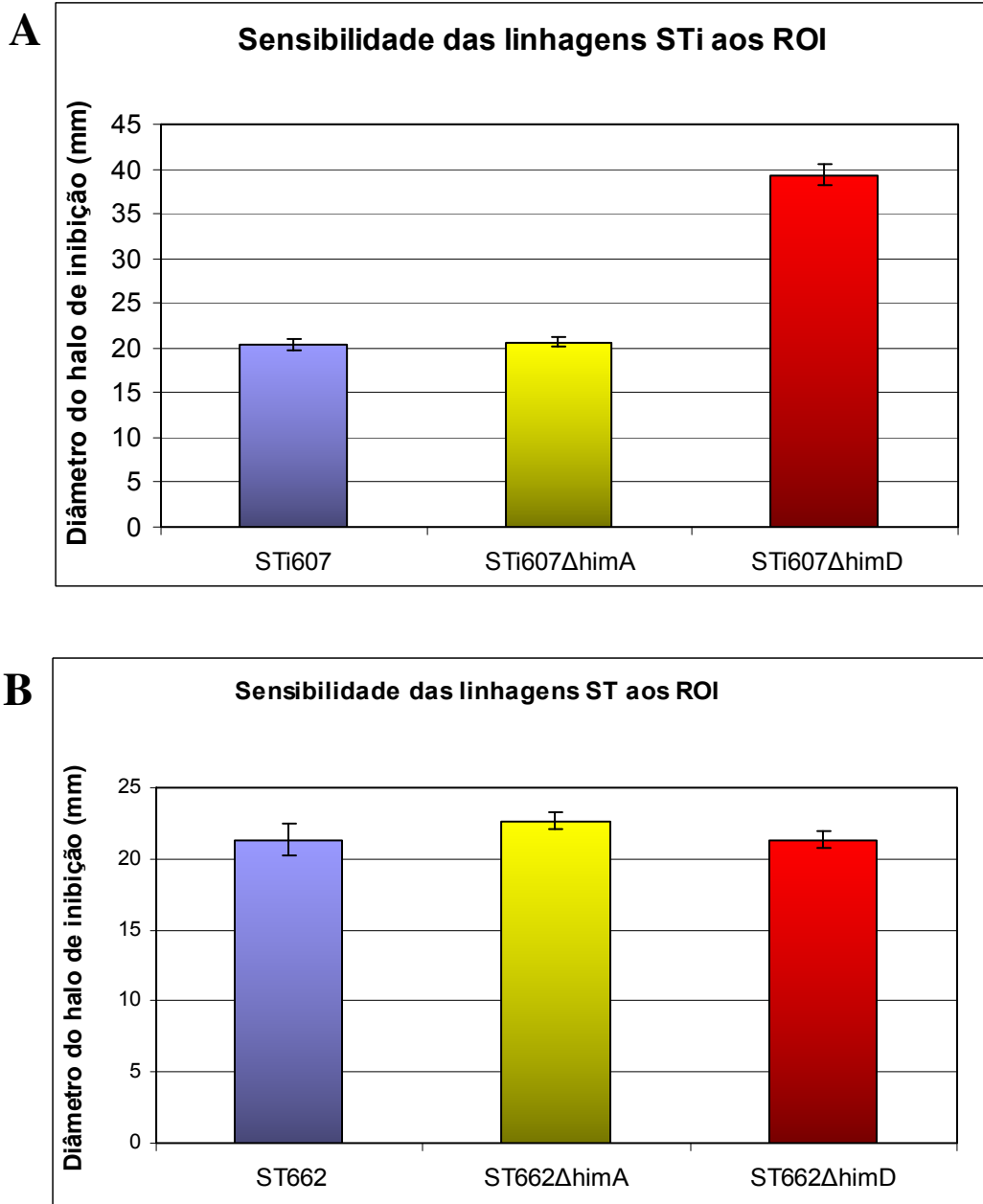


**Figura 10-** Crescimento da linhagem ST662 e mutantes ST662ΔhimA e ST662ΔhimD nos tempos 0, 3 e 6 horas na presença de reativos intermediários de nitrogênio. Observa-se uma diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre ST662 e os mutantes ST662ΔhimA e ST662ΔhimD.

#### 4.3.1.3- Resistência a Reativos Intermediários do Oxigênio (ROI)

Na Figura 11A observa-se que a linhagem STi607ΔhimD apresentou maior sensibilidade ao paraquat quando comparada com STi607. Testes estatísticos demonstraram que tais diferenças são estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ). STi607ΔhimA não apresentou diferença significativa em relação à linhagem selvagem quanto à resistência ao paraquat.

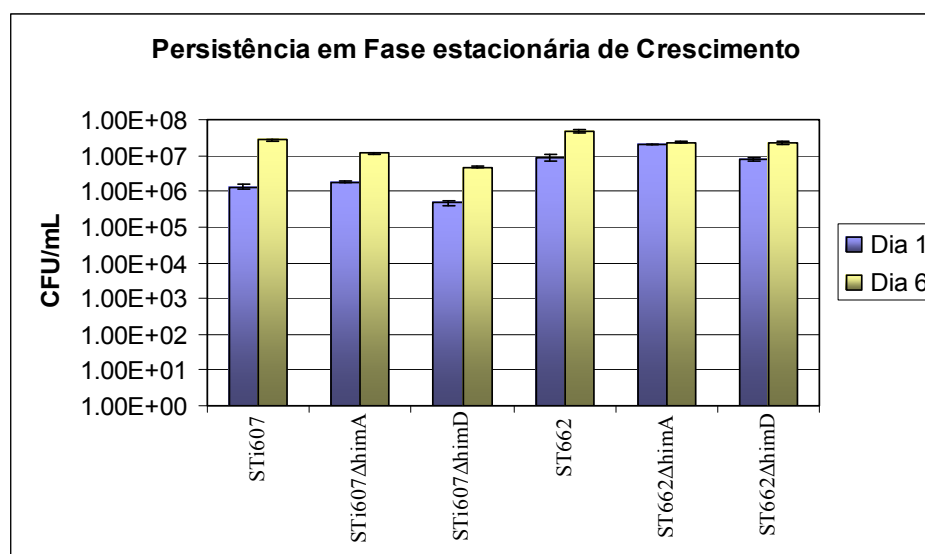
Não foram observadas diferenças significativas quanto à resistência ao paraquat (1,9%) entre ST662 e as linhagens mutantes (ST662ΔhimA e ST662ΔhimD) (Figura 11B).



**Figura 11-** Diâmetro do halo de inibição observado para a linhagem STi607 e mutantes STi607ΔhimA e STi607ΔhimD (A) e para ST662 e mutantes ST662ΔhimA e ST662ΔhimD (B) Diâmetro do halo de inibição em culturas crescidas na presença de paraquat (1,9%). Diferenças estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ) foram observadas apenas entre STi607 e STi607ΔhimD.

#### 4.3.1.4- Sobrevivência em Fase Estacionária de Crescimento

A capacidade das linhagens mutantes de *S. enterica* sobreviverem em meio com escassez de nutrientes foi testada avaliando-se as variações em CFU destas linhagens na fase estacionária de crescimento, comparando-se os dados com os valores de CFU obtidos com as linhagens selvagens. Em ambos os casos, independente da sorovariedade (ST ou STi), mutantes *himA* e *himD* foram capazes de sobreviver nessas condições igualmente às linhagens selvagens. Assim, as diferenças observadas não foram estatisticamente significantes para  $P \leq 0,05$  (Figura 12).

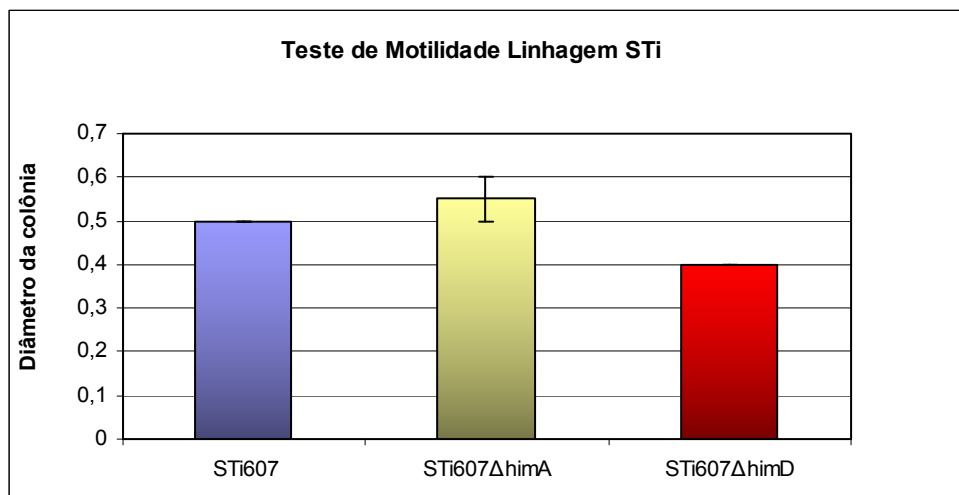


**Figura 12-** Crescimento das linhagens ST662, STi607 e mutantes *himA* e *himD* até a fase estacionária de crescimento inicial (1 dia) e tardia (6 dias) avaliado através da determinação da CFU. Os valores referem-se a três repetições. O desvio padrão de cada linhagem está indicado. As diferenças não foram estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ) para nenhuma das linhagens.

#### 4.3.1.5- Teste de Motilidade

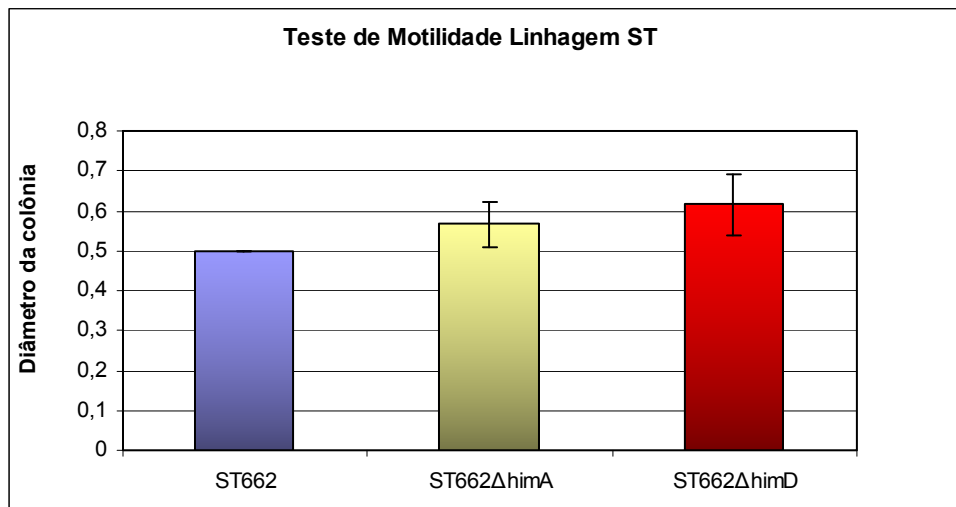
Após 24 horas de crescimento o diâmetro de cada colônia foi medido e os valores lançados em gráficos (Figuras 13 e 14). As barras em cada coluna indicam o desvio padrão encontrado em cada amostra. Não foram encontradas diferenças significativas entre

as linhagens mutantes e suas respectivas selvagens quando a motilidade, nas condições testadas ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 13-** Diâmetro médio de colônias da linhagem STi607 e mutantes *himA* e *himD* após 24 horas de crescimento. As linhagens foram crescidas em meio semi-sólido LB. Os valores referem-se a três repetições e o desvio padrão está indicado para cada linhagem. Não foram observadas diferenças significativas para  $P \leq 0,05$ .

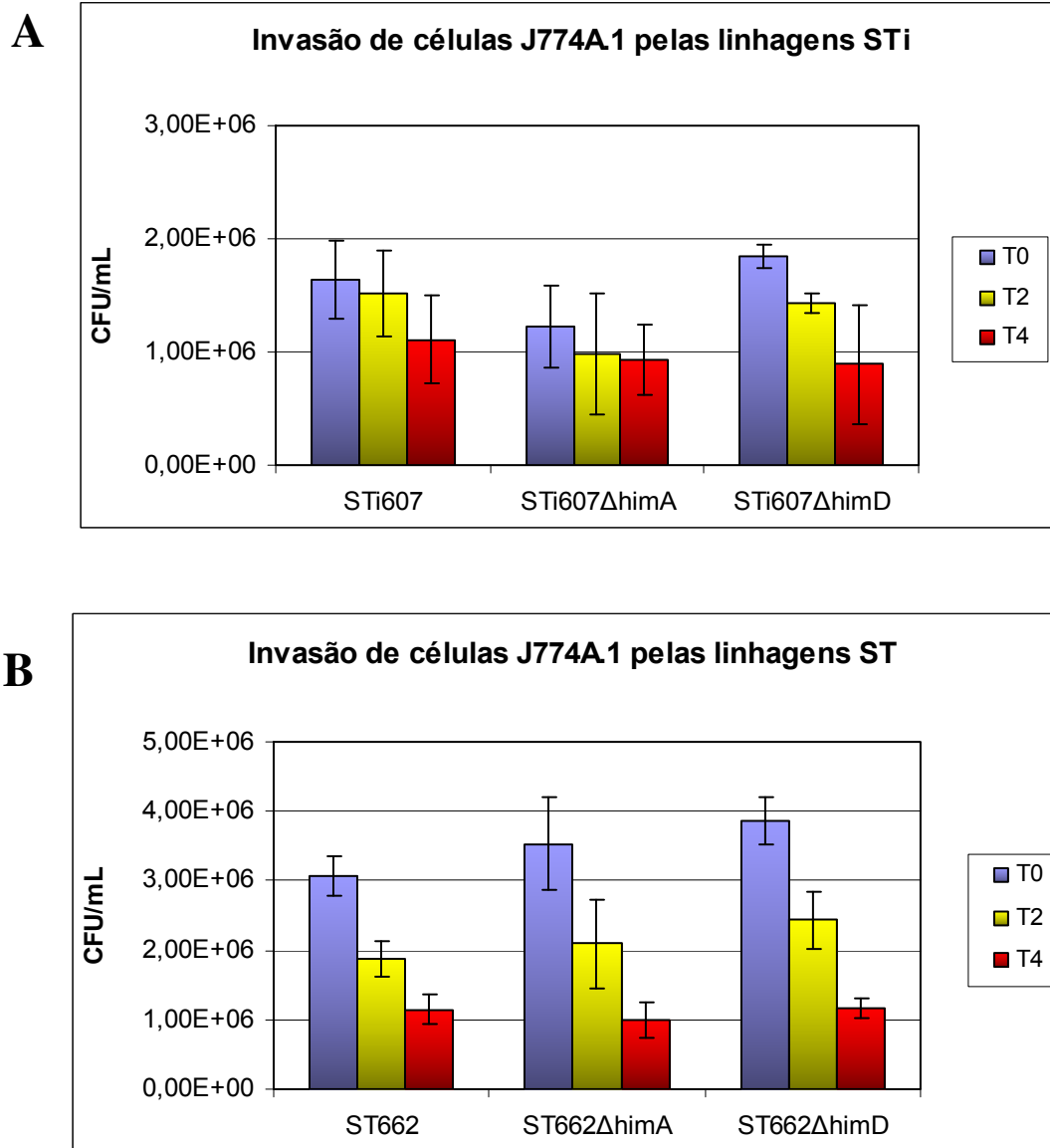




**Figura 14-** Diâmetro médio de colônias da linhagem ST662 e mutantes *himA* e *himD* após 24 horas de crescimento. As linhagens foram crescidas em meio semi-sólido LB. Os valores referem-se a três repetições e o desvio padrão está indicado para cada linhagem. Não foram observadas diferenças significativas para  $P \leq 0,05$ .

#### 4.3.1.6- Ensaio de Invasão e Sobrevivência em Macrófagos

A capacidade de invadir e sobreviver no interior de macrófagos é um fator muito importante para a virulência de *Salmonella enterica*. Dessa forma, a invasão e sobrevivência das linhagens mutantes *himA* e *himD* foram testadas utilizando cultura de células de macrófagos J774A.1 e os valores obtidos foram comparados com as linhagens selvagens. Quando comparadas às linhagens selvagens, nenhuma das linhagens mutantes apresentou diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) quanto a essas características (Figuras 15A e 15B).



**Figura 15-** Invasão e sobrevivência intracelular em células J774A.1 exibidos pelas linhagens STi607, ST662 e os respectivos mutantes *himA* e *himD* (Painéis **A** e **B**, respectivamente). Os valores referem-se à CFU obtida logo após (T0), 2 horas (T2) e 4 horas (T4) de invasão celular. Este experimento foi realizado em triplicata e o desvio padrão referente a estas repetições está indicado. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ).

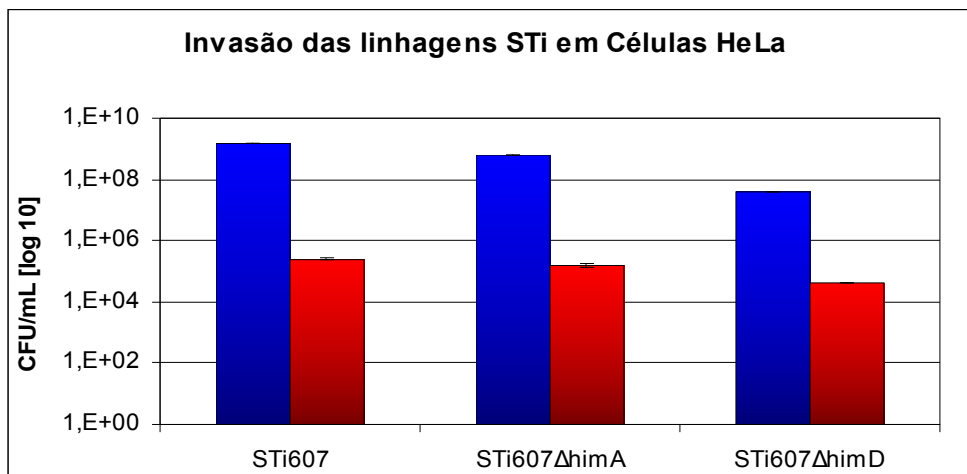
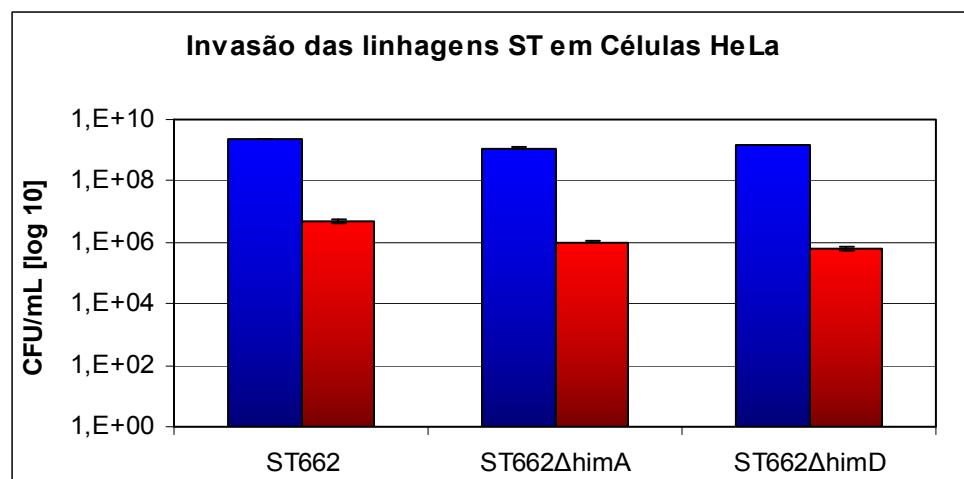
#### 4.3.1.7- Teste de adesão e invasão em células HeLa e HEp-2

##### 4.3.1.7.1- Adesão

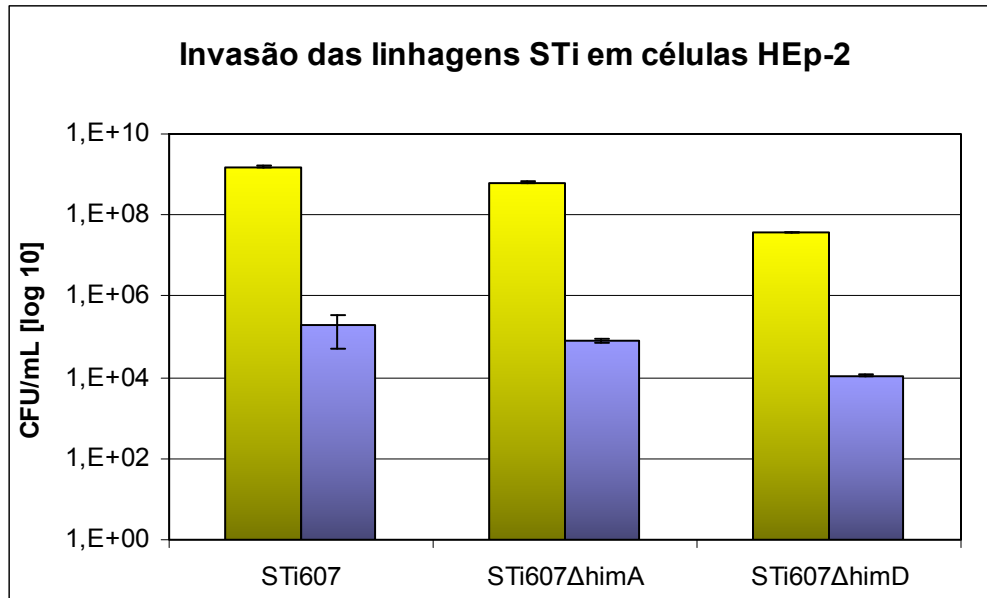
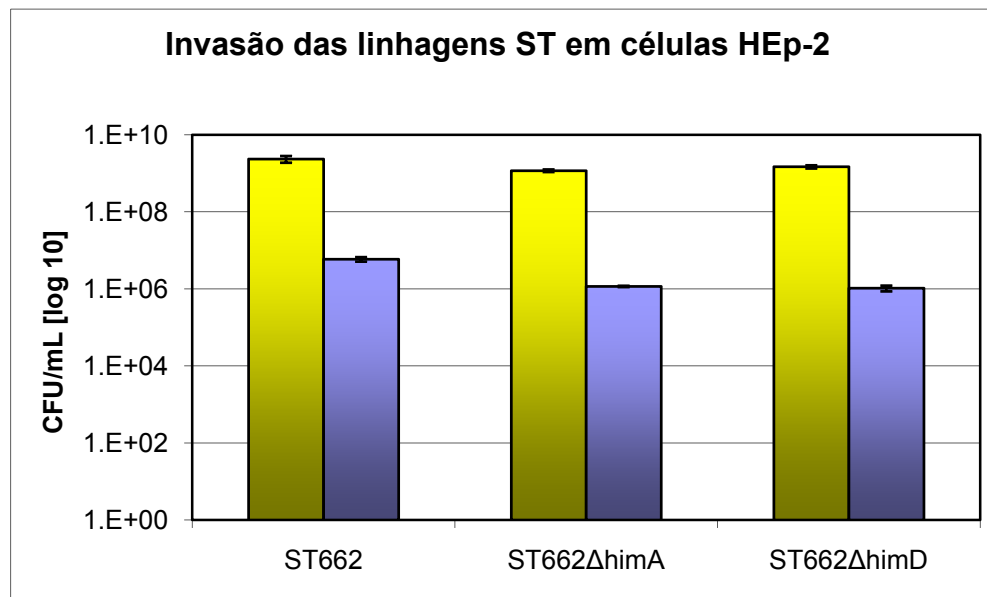
A adesão celular é um passo muito importante no processo de colonização (Ly e Casanova, 2007). A interação com a célula hospedeira é o primeiro passo para a sua colonização. Quando comparadas com as respectivas linhagens selvagens, quanto a capacidade de adesão em células HeLa, as linhagens mutantes não apresentaram diferença significativa, demonstrando igual capacidade de aderir nessas células (dados não mostrados).

##### 4.3.1.7.2- Invasão de células HeLa e HEp-2

A infecção por *S. enterica* inicia-se através da invasão e proliferação em células do epitélio intestinal (Ly e Casanova, 2007). A capacidade de invadir células não-fagocitárias está diretamente relacionada a genes presentes na Ilha de Patogenicidade I (Gerlach *et al.*, 2007). Sendo assim, foi testada a capacidade de invasão das linhagens selvagens e mutantes em células não fagocitárias HeLa (Figura 16 A e 16 B) e HEp-2 (Figura 17 A e 17 B). Não foram encontradas diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre a capacidade de invasão das linhagens mutantes comparadas com as respectivas selvagens.

**A****B**

**Figura 16-** Invasão de células HeLa pelas linhagens selvagens STi607 e ST662 e mutantes *himA* e *himD*. Nas colunas à esquerda observa-se a CFU inoculada e à direita a CFU recuperada após 3 horas de invasão. **A)** Linhagem STi607 e mutantes. **B)** Linhagens ST662 e mutantes. As diferenças observadas não foram estatisticamente significantes para  $P \leq 0,05$ .

**A****B**

**Figura 17-** Invasão de células Hep-2 pelas linhagens selvagens STi607 e ST662 e mutantes *himA* e *himD*. Nas colunas à esquerda observam-se, CFU inoculada e à direita a CFU recuperada após 3 horas de invasão. **A)** Linhagem STi607 e mutantes. **B)** Linhagens ST662 e mutantes. As diferenças observadas não foram estatisticamente significativas para  $P \leq 0,05$ .

#### 4.3.2- Caracterização genotípica: Detecção da presença de genes de virulência em *S. enterica*

Ambos os genes, de invasão (*invE/A*) e de multiplicação *in vivo* (*spvC*), foram identificados tanto nas linhagens selvagens quanto nas linhagens mutantes (dados não mostrados) indicando que após a mutagênese as linhagens não perderam os mesmos.

#### 4.4- Atenuação e proteção no modelo murino

##### 4.4.1- Determinação da Dose Letal (DL<sub>50</sub>) intraperitoneal em camundongos

Os valores de DL<sub>50</sub>, em camundongos inoculados pela via intraperitoneal, calculados pelo método “*Moving Average Interpolation*” (Welkos e O’Brien, 1994) são demonstrados na Tabela 6. Observa-se que a DL<sub>50</sub> das amostras selvagens ficaram em torno de 10<sup>3</sup> CFU enquanto das linhagens mutantes para o gene *himA* em torno de 10<sup>5</sup> CFU e para os mutantes *himD* em torno de 10<sup>6</sup> CFU.

**Tabela 6-** DL<sub>50</sub> em camundongos BALB/c inoculados pela via intraperitoneal

	<b>DL<sub>50</sub></b>	<b>Referência</b>
STi607	3.134 x 10 <sup>3</sup>	Este estudo
STi607Δ <i>himA</i>	2.688 x 10 <sup>5</sup>	Este estudo
STi607Δ <i>himD</i>	8.854 x 10 <sup>6</sup>	Este estudo
ST662	2.000 x 10 <sup>3</sup>	Este estudo
ST662Δ <i>himA</i>	1.703 x 10 <sup>5</sup>	Este estudo

##### 4.4.2- Determinação da Dose Letal (DL<sub>50</sub>) oral em camundongos

Os valores de DL<sub>50</sub> por via oral em camundongos BALB/c, calculados pelo método “*Moving Average Interpolation*” (Welkos e O’Brien, 1994) para as linhagens de *S. enterica* mutantes e selvagens estão descritos na Tabela 7. As doses selecionadas para inóculo foram baseadas nos resultados de DL<sub>50</sub> obtidos pela via intraperitoneal de inóculo, porém observa-se que os valores de DL<sub>50</sub> relacionados à administração bacteriana por via

oral são superiores a  $DL_{50}$  por via intraperitoneal (Tabela 7), resultado este já esperado. As doses letais médias para ambos os mutantes não foram atingidas com as CFU utilizadas no experimento, ficando superiores a  $10^7$  para *himA* e  $10^8$  para *himD*.

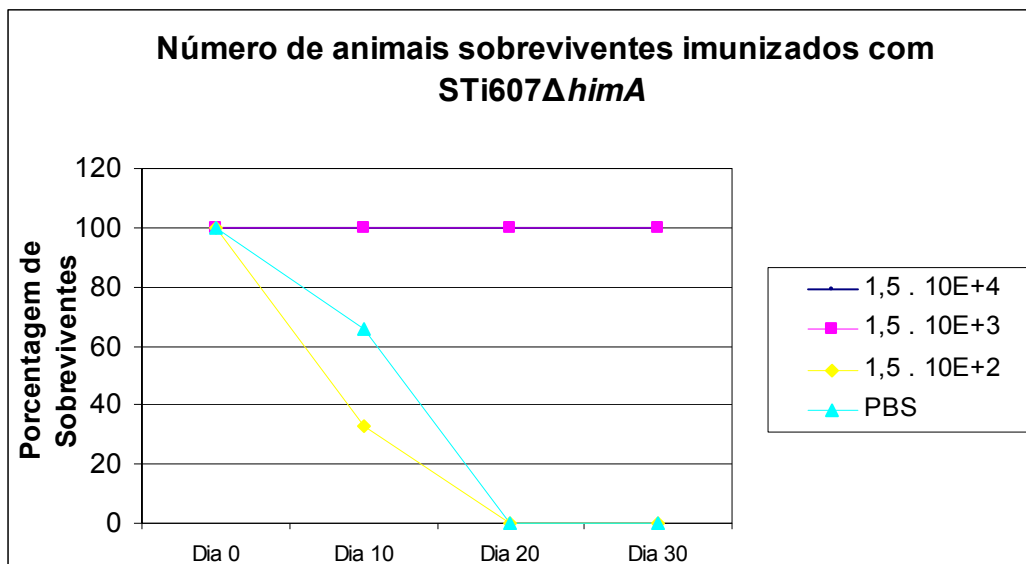
**Tabela 7-**  $DL_{50}$  de linhagens de *S. enterica* inoculadas por via oral em camundongos BALB/c

	<b>DL50</b>	<b>Referência</b>
STi607	$2.000 \times 10^3$	Este estudo
STi607 $\Delta$ <i>himA</i>	$> 1.4 \times 10^7$	Este estudo
STi607 $\Delta$ <i>himD</i>	$> 2.5 \times 10^8$	Este estudo
ST662	$2.400 \times 10^2$	Este estudo
ST662 $\Delta$ <i>himA</i>	$> 2.5 \times 10^7$	Este estudo
ST662 $\Delta$ <i>himD</i>	$> 2.6 \times 10^8$	Este estudo

#### 4.4.3- Desafio com as linhagens selvagens pela via intraperitoneal

Apesar de *S. enterica* iniciar a infecção por aderir e invadir células da mucosa intestinal, após a sua ingestão pelo hospedeiro, a imunização pela via intraperitoneal é um procedimento bastante útil, uma vez que o patógeno é inoculado de forma sistêmica no hospedeiro, sendo que a resposta imune desencadeada e a proteção conferida contra a infecção são parâmetros importantes na avaliação da imunogenicidade conferida pelas linhagens vacinais a nível sistêmico.

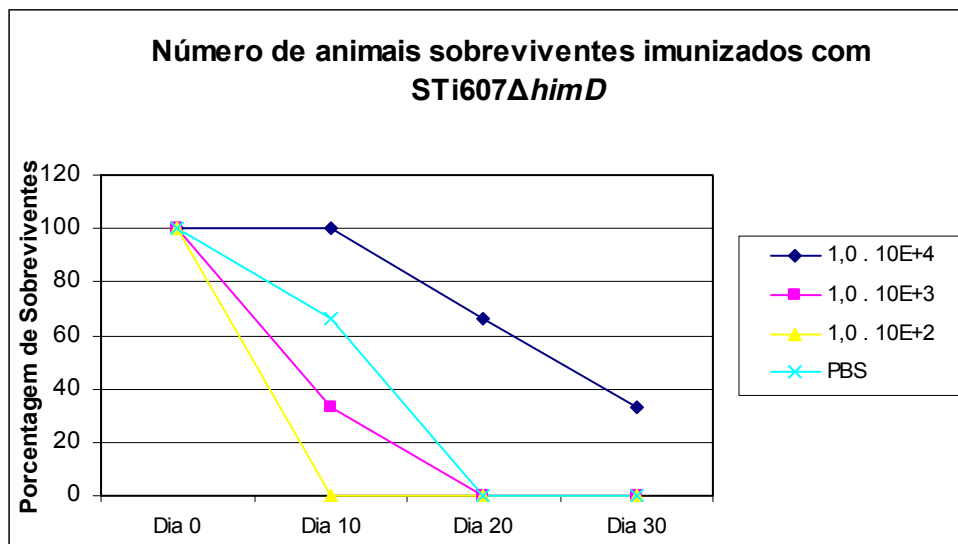
Na Figura 18, observa-se que 100% dos animais imunizados com doses inferiores à  $DL_{50}$  ( $10^3$  e  $10^4$  células bacterianas) da linhagem STi607 $\Delta$ *himA*, sobreviveram ao desafio com dose letal ( $3.10^5$  CFU/mL) da linhagem selvagem STi607. Os animais imunizados com a dose com cerca de  $10^2$  células da linhagem mutante e o controle (animais inoculados com tampão PBS), morreram aproximadamente após 10 dias de desafiados.



**Figura 18-** Desafio e sobrevivência de camundongos imunizados com diferentes doses da linhagem mutante *STi607ΔhimA*. O eixo das ordenadas indica o número de animais sobreviventes ao desafio com dose letal ( $3 \cdot 10^5$  CFU/mL) da linhagem selvagem (*STi607*) ao longo do tempo (eixo das abscissas).

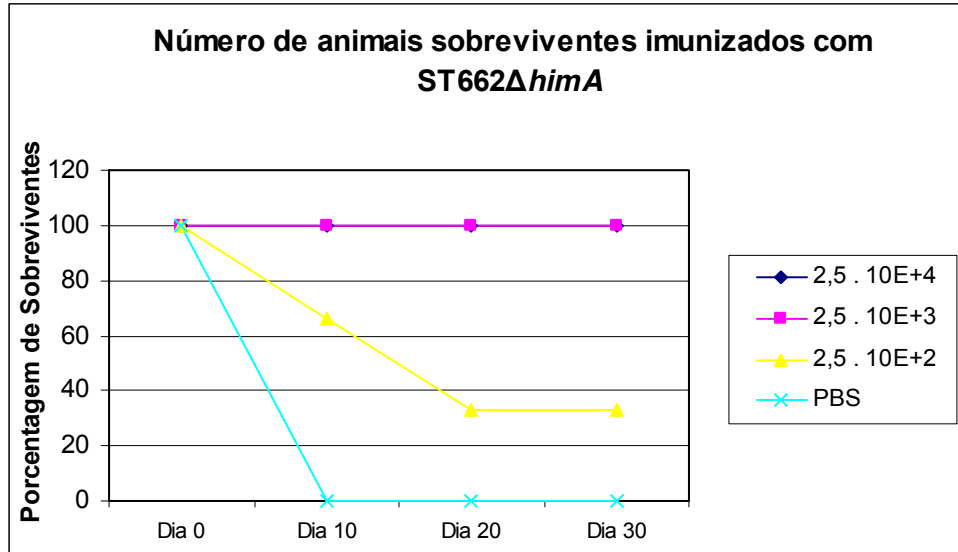
A linhagem *STi607ΔhimD* não foi capaz de desencadear uma resposta imune efetiva com as doses ministradas neste experimento. Na Figura 19 observa-se que 33% dos animais imunizados com as doses mais elevadas ( $1 \cdot 10^4$  CFU/mL) sobreviveram ao desafio. Os demais animais morreram no décimo dia do desafio em diante.





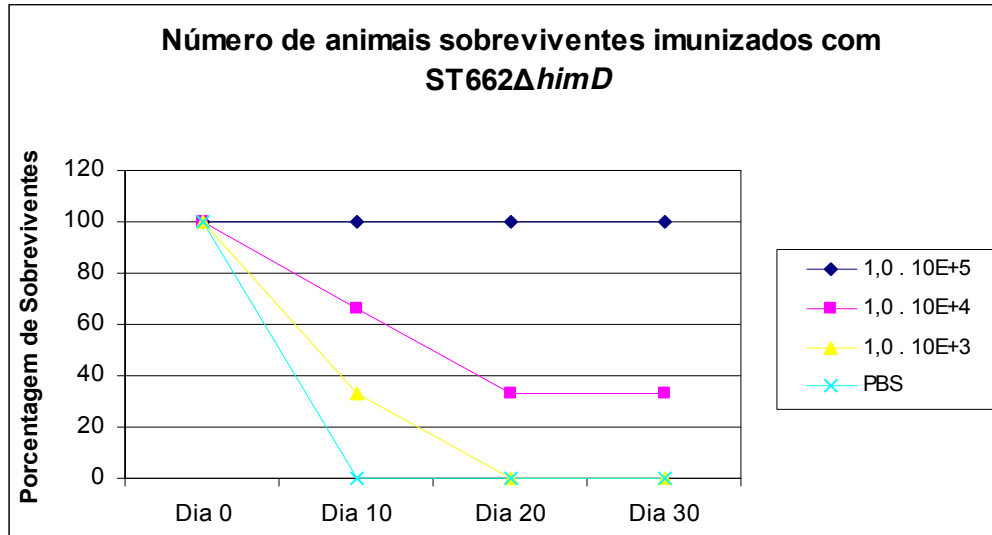
**Figura 19-** Desafio e sobrevivência de camundongos imunizados com diferentes doses da linhagem mutante STi607ΔhimD. O eixo das ordenadas indica o número de animais sobreviventes ao desafio com dose letal ( $3 \cdot 10^5$  CFU/mL) da linhagem selvagem (STi607) ao longo do tempo (eixo das abscissas).

Com relação à linhagem ST662, todos os camundongos BALB/c imunizados com as duas doses imediatamente inferiores à  $DL_{50}$  ( $2,5 \cdot 10^4$  e  $2,5 \cdot 10^3$  CFU/mL) do mutante ST662ΔhimA sobreviveram ao desafio com dose letal ( $2 \cdot 10^5$  CFU/mL) da linhagem selvagem (Figura 20). Grupos imunizados com doses mais baixas deste mutante apresentaram aproximadamente 33% de sobrevivência, enquanto o grupo tratado com placebo não apresentou sobreviventes.



**Figura 20-** Desafio e sobrevivência de camundongos imunizados com diferentes doses da linhagem mutante ST662 $\Delta$ himA. O eixo das ordenadas indica o número de animais sobreviventes ao desafio com dose letal ( $3 \cdot 10^5$  CFU/mL) da linhagem selvagem (ST662) ao longo do tempo (eixo das abscissas).

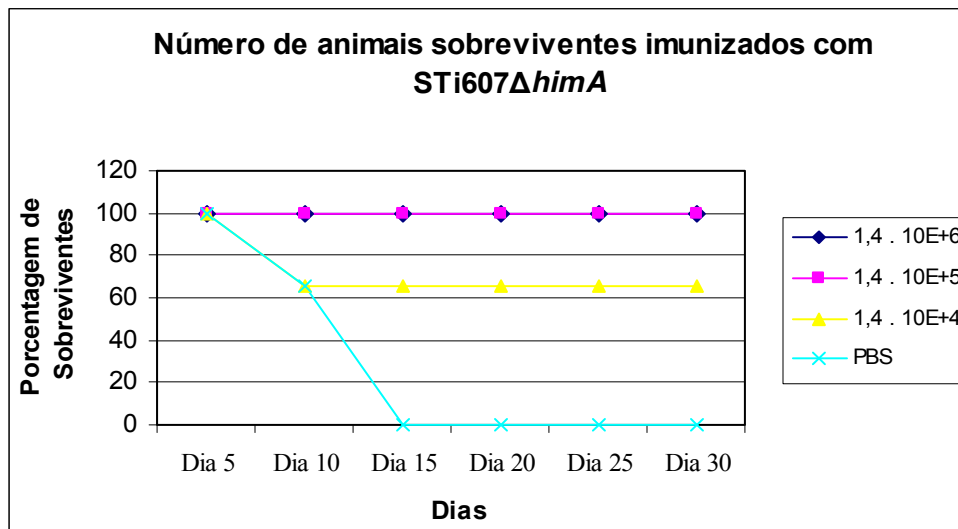
Na Figura 21 observa-se o número de camundongos sobreviventes imunizados com a linhagem ST662 $\Delta$ himD. Após o desafio, todos os animais imunizados previamente com doses imediatamente inferiores  $DL_{50}$  ( $1 \cdot 10^5$  CFU/mL) sobreviveram, enquanto os imunizados com doses de  $10^4$  apresentaram uma taxa de sobreviventes de 33%. Os grupos com doses de  $10^3$  e PBS não apresentaram sobreviventes.



**Figura 21-** Desafio e sobrevivência de camundongos imunizados com diferentes doses da linhagem mutante *ST662ΔhimD*. O eixo das ordenadas indica o número de animais sobreviventes ao desafio com dose letal ( $3 \cdot 10^5$  CFU/mL) da linhagem selvagem (*ST662*) ao longo do tempo (eixo das abscissas).

#### 4.4.4- Desafio via oral com as linhagens selvagens

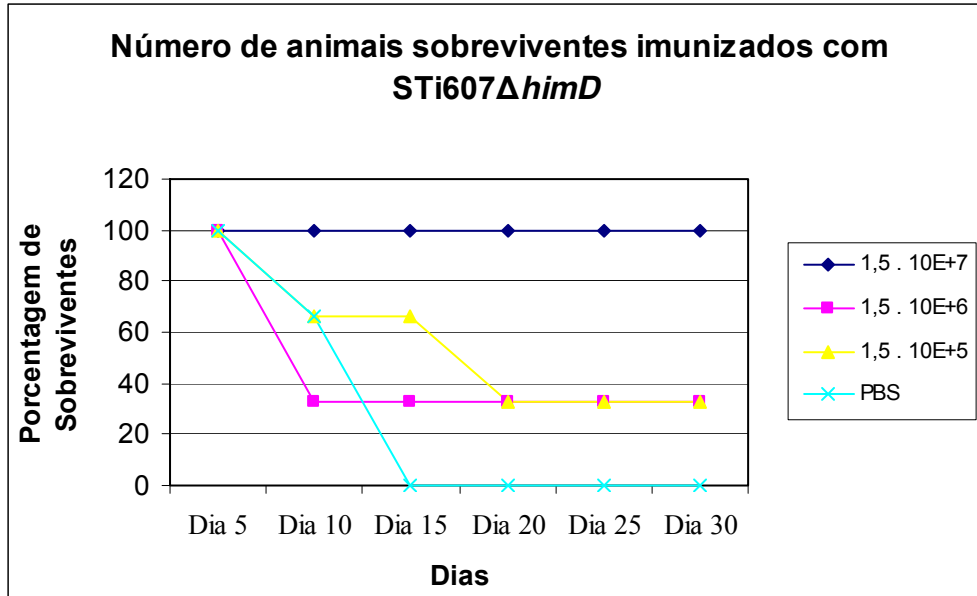
Como descrito anteriormente, camundongos BALB/c foram imunizados com concentrações variáveis de células das linhagens mutantes de *S. enterica* e a sobrevivência avaliada em função do tempo. Na Figura 22 observa-se que todos os camundongos imunizados com uma única dose de  $10^5$  ou  $10^6$  CFU da linhagem *STi607ΔhimA* sobreviveram quando desafiados com doses letais ( $10^7$  CFU/mL) da linhagem selvagem *STi607*, 30 dias após a imunização. Quando imunizados com  $10^4$  CFU de *STi607ΔhimA*, 66% dos animais sobreviveram ao desafio (Figura 22).



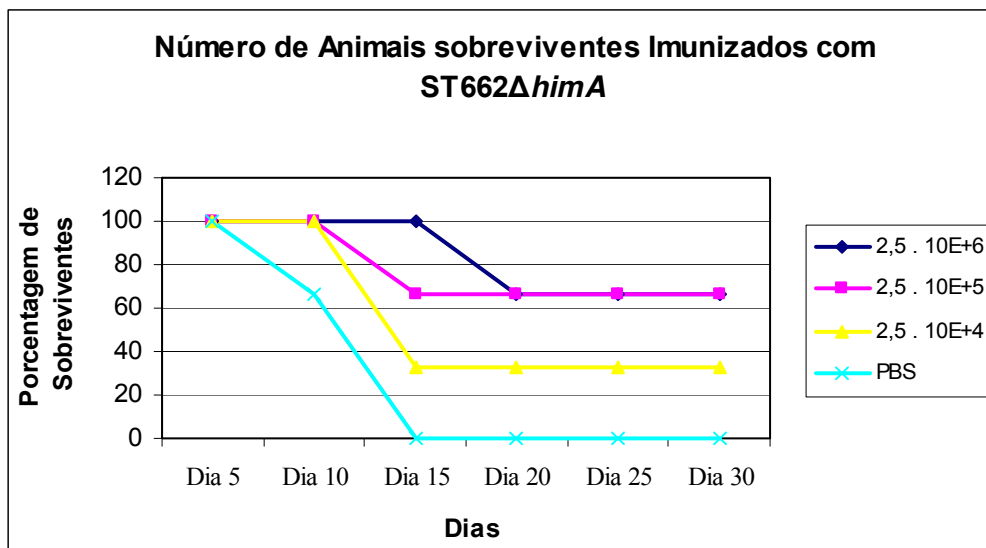
**Figura 22-** Desafio e sobrevivência, em porcentagem, de camundongos BALB/c imunizados com diferentes doses da linhagem mutante *STi607ΔhimA*. O eixo das ordenadas indica o número de animais sobreviventes ao desafio com dose letal ( $10^7$  CFU/mL) da linhagem selvagem (*STi607*) ao longo do tempo (eixo das abscissas).

Os resultados obtidos com a linhagem *STi607ΔhimD* indicaram sobrevivência de 100% dos camundongos imunizados com  $10^7$  CFU, enquanto os grupos imunizados com  $10^6$  e  $10^5$  CFU apresentaram 33% de sobrevivência (Figura 23).

Os grupos imunizados com a linhagem *ST662ΔhimA*, nas doses  $10^6$  e  $10^5$  CFU, apresentaram sobrevivência de 66% dos animais. Na dose de  $10^4$  CFU, a porcentagem de 33% dos animais sobreviveu (Figura 24).

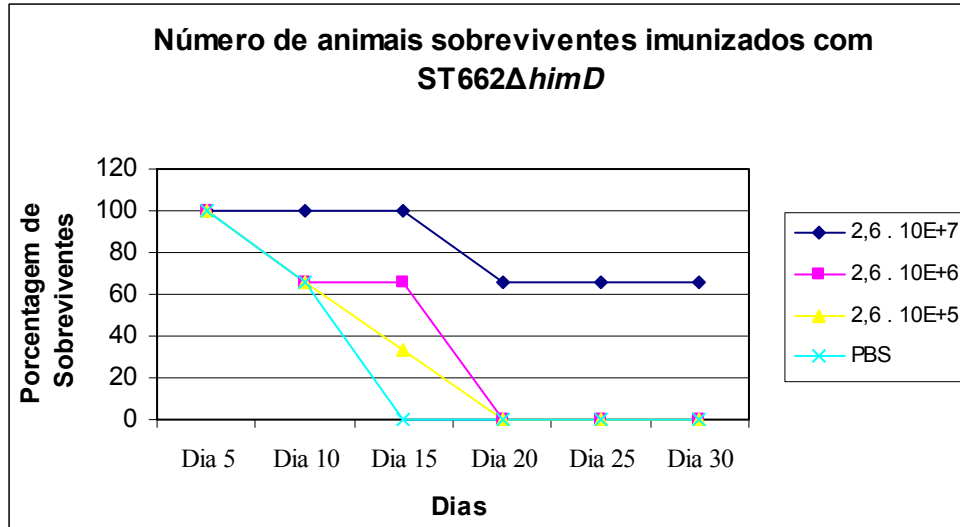


**Figura 23-** Desafio e sobrevivência, em porcentagem, de camundongos imunizados com diferentes doses da linhagem mutante STi607 $\Delta$ himD. O eixo das ordenadas indica o número de animais sobreviventes ao desafio com dose letal ( $10^7$  CFU/mL) da linhagem selvagem (STi607) ao longo do tempo (eixo das abscissas).



**Figura 24-** Desafio e sobrevivência, em porcentagem, de camundongos imunizados com diferentes doses da linhagem mutante *ST662ΔhimA*. O eixo das ordenadas indica o número de animais sobreviventes ao desafio com dose letal ( $10^6$  CFU/mL) da linhagem selvagem (*ST662*) ao longo do tempo (eixo das abscissas).

Nas imunizações com *ST662ΔhimD*, apenas os animais que receberam doses de  $10^7$  CFU sobreviveram ao desafio com linhagem selvagem, a uma taxa de 66%. Os demais grupos, apesar de terem o tempo de vida prolongado, morreram após 20 dias do desafio (Figura 25). Todos os grupos onde os animais foram tratados com placebo morreram entre o 5º e o 10º dia após serem desafiados com as linhagens selvagens.



**Figura 25-** Desafio e sobrevivência, em porcentagem, de camundongos imunizados com diferentes doses da linhagem mutante ST662 $\Delta$ himD. O eixo das ordenadas indica o número de animais sobreviventes ao desafio com dose letal ( $10^6$  CFU/mL) da linhagem selvagem (ST662) ao longo do tempo (eixo das abscissas).

## **5- DISCUSSÃO**



A busca por uma vacina viva atenuada de *S. enterica*, para ser utilizada como carreadora de antígenos heterólogos, com o potencial de ser utilizada na imunização contra a salmonelose e outras doenças, compõe um importante capítulo da história da microbiologia (revisado por Guzman *et al.*, 2006). Para alcançar este objetivo, optamos por construir mutantes de *S. enterica* nulos para os genes *himA* e *himD*, que codificam os polipeptídeos constituintes do Fator de Integração do Hospedeiro (do inglês *Integration Host Factor*, IHF). A expressão de IHF é aumentada na fase estacionária de crescimento e vários genes importantes para a sobrevivência bacteriana nesta fase estão sob o controle positivo do mesmo (Ishihama, 2000). IHF impõe ao DNA curvaturas de aproximadamente 180° (Lorenz *et al.*, 1999), sendo essa habilidade capaz de induzir importantes alterações topológicas relevantes à organização do nucleóide (Thanbichler *et al.*, 2005), sendo ainda encontrado como cofator em numerosos processos regulatórios (Goosen e van de Putte, 1995).

Desta forma, a hipótese por nós testada foi a de que mutantes de *S. enterica* incapazes de produzir IHF eram atenuados com relação à virulência e imunogênicos.

Para a construção dos mutantes, o sistema  $\lambda$  Red foi utilizado (Datsenko e Wanner, 2000). Este sistema de recombinação homóloga demonstrou-se uma ferramenta muito importante em biologia molecular, no entanto, seu uso não é trivial para a utilização com a maioria dos microrganismos. Em nosso trabalho, o tempo requerido para a sua padronização foi de aproximadamente 10 meses. Após a sua padronização, a obtenção de linhagens recombinantes tornou-se muito rápida sendo muitas vezes obtidas em menos de 5 dias.

Para este trabalho, foram selecionadas 2 linhagens de *S. enterica* isoladas a partir de coprocultura de pacientes com quadro clínico de salmonelose. Essas linhagens pertencem à coleção do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular (Instituto de Biologia – UNICAMP) nosso laboratório e foram caracterizadas pela Dra Ana Isabela Lopes Sales (Sales *et al.*, 2007). A seleção das linhagens foi baseada na caracterização fenotípica e molecular das mesmas, uma vez que ambas apresentam os fatores de virulência característicos de *S. enterica* Typhimurium sendo capazes de causar infecção sistêmica no

modelo murino. Dessa forma, foram selecionadas as linhagens STi607 e ST662. A caracterização quanto à sensibilidade aos antimicrobianos ampicilina, cloranfenicol e gentamicina foi um fator muito importante para o desenvolvimento do trabalho, uma vez que estes seriam utilizados no processo de construção e seleção das linhagens mutantes.

As linhagens mutantes foram construídas pela recombinação homóloga, sítio dirigida, do cassete de recombinação com os genes *himA* e *himD*. Esses cassetes foram construídos por PCR, tendo como molde o plasmídeo pKD3. A seleção desse molde foi baseada na presença do gene *cat*, que confere aos mutantes a resistência ao cloranfenicol, ao contrário da utilização do plasmídeo pKD4 que teria a amplificação do gene *kan*, que confere resistência à kanamicina. O uso de kanamicina como fator seletivo dos recombinantes não foi possível devido à resistência natural a este antimicrobiano exibido pelas linhagens de *S. enterica* selecionadas para este estudo.

Recentemente, Mangan *et al.* (2006) estudaram a expressão gênica diferencial de mutantes de *S. enterica* Typhimurium com deleções nos genes *himA*, *himD* ou ambos. A expressão diferencial de genes foi feita por micro-arranjos. Os resultados de Mangan *et al.* (2006) serviram de base para muitas das análises realizadas com as linhagens de nosso estudo.

O início da caracterização das linhagens mutantes foi a avaliação da curva de crescimento *in vitro* onde foram observados os valores de DO<sub>600</sub> e a CFU em função do tempo de crescimento. Neste experimento, observou-se uma clara diferença entre as linhagens mutantes e nas respectivas selvagens; todos os mutantes apresentaram um tempo de crescimento aumentado. Segundo Mangan *et al.* (2006) mutantes de *S. enterica* nulos para os genes *himA* e *himD* não apresentam alterações no tempo de crescimento. No entanto, as linhagens utilizadas em nosso trabalho se comportaram de forma diferente, principalmente o mutante STi607 $\Delta$ *himD* que apresentou a maior discrepância em relação ao tempo de crescimento. As diferenças entre os resultados descritos por Mangan *et al.* (2006) e os resultados por nós obtidos podem ser devido a diferenças no genoma das linhagens estudadas. Nossos estudos foram propositalmente realizados utilizando duas linhagens diversas de *S. enterica*, pois, de fato, estudos prévios em nosso Laboratório demonstraram diferenças significativas na expressão de genes entre diferentes linhagens de

*S. enterica*, mesmo quando a mesma construção, contendo os mesmos genes “reporters” e os mesmos promotores foram utilizados (Brandão *et al.*, manuscrito em preparo). A questão da influência das diferenças genética na resposta de *S. enterica* a fatores ambientais será abordada novamente ao longo do texto.

Microrganismos evoluíram uma variedade de estratégias para defesa contra a toxicidade das espécies reativas do oxigênio (ROI), nitrogênio (RNI) entre outras (Lu *et al.*, 2002). A sobrevivência aos RNI e ROI é essencial para o sucesso da colonização do hospedeiro por patógenos intracelulares (Lu *et al.*, 2002), e com *S. enterica* Typhimurium não é diferente (Lu *et al.*, 1999)

Quando testadas quanto à capacidade de sobreviver aos RNI, observamos que após um período de tempo prolongado, 6 horas, as linhagens mutantes de STi607 não apresentaram diferença significativa em relação a esta característica quando comparadas à STi607, sendo que após 6 horas as CFU eram bastante baixas. O mesmo não ocorreu com as linhagens ST662, visto que após o mesmo período de crescimento a linhagem ST662 $\Delta$ *himD* apresentou significativa resistência aos reativos intermediários de nitrogênio, comparada à ST662. Até o momento não se conhece a relação de IHF com a resistência à esses intermediários, no entanto, devido a diferença encontrada entre as linhagens mutantes STi607 $\Delta$ *himD* e ST662 $\Delta$ *himD*, podemos novamente inferir que a diferença no genoma bacteriano influencia de forma considerável esta característica. Desta forma, nossa hipótese é que a resistência aos RNI é uma característica polimórfica, controlada por vários genes, de tal forma que o comportamento frente à mutação em uma proteína ligante de DNA será variável e de acordo com o conteúdo gênico e a forma como estes são controlados na linhagem bacteriana. Sendo assim, o heterodímero IHF inibe de forma direta ou indireta a expressão de algum gene ou genes associados à resistência aos RNI em *S. enterica* Typhimurium ST662, o mesmo não acontecendo com *S. enterica* I,4,[5],12:i:- STi607.

Com relação à sensibilidade aos ROI, a única diferença estatisticamente significativa encontrada foi entre STi607 $\Delta$ *himD* e STi607, onde pode-se observar que a linhagem mutante tornou-se mais sensível a estes reativos. Estes resultados corroboram os dados obtidos por Mangan *et al.* (2006) uma vez que estes autores observaram que mutantes *himD* eram mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio do que a linhagem

selvagem. Por outro lado, Mangan *et al.* (2006) também observaram maior suscetibilidade de mutantes *himA*, resultado este diferente dos obtidos em nosso estudo. No caso do mutante STi607 $\Delta$ *himD*, esta sensibilidade pode estar relacionada ao crescimento mais lento desta linhagem, verificada com a curva de crescimento *in vitro* discutida anteriormente. Contudo, outros ensaios devem ser feitos para confirmar esta hipótese. De qualquer forma, nossos resultados novamente atestam para a importância do *background* genético na resposta a fatores ambientais.

Os resultados dos experimentos de resistência aos RNI e ROI nos permitem concluir que a atenuação quanto à virulência observada nas linhagens mutantes não ocorreu em função de uma maior sensibilidade das mesmas a estes reativos.

A habilidade de sobreviver sob condições de restrição de nutrientes contribui para a persistência bacteriana, podendo ser um fator de grande importância para a virulência (Lu *et al.*, 1999). Apesar de IHF ser um importante fator regulatório, que modula positiva ou negativamente certo número de genes, nossos resultados indicaram que mutantes *himA* e *himD* não apresentam deficiências quanto à capacidade de persistir em ambientes pobres, sob condições de estresse nutricional, mimetizados pelo cultivo prolongado em fase estacionária de crescimento (6 dias). Este é um resultado não esperado uma vez que IHF regula uma série de genes importantes na adaptação à fase estacionária de crescimento (Mangan *et al.*, 2006), embora parece não influenciar a expressão do fator sigma de fase estacionária,  $\sigma^S$  (Mangan *et al.*, 2006). É importante salientar que existem três formas de IHF, formadas pelo heterodímero HimA/HimD e pelos homodímeros HimA/HimA e HimD/HimD (Ishihama, 2000). Desta forma, a adaptação à fase estacionária pode ser mediada em parte pelos homodímeros. Esta condição de sobrevivência nos permite inferir que a atenuação das linhagens mutantes não está relacionada a uma menor capacidade de sobrevivência sob condições de estresse presentes na fase estacionária. Um experimento interessante a ser realizado é o experimento de competição, onde uma cultura mista contendo quantidades iguais de mutante e da linhagem selvagem são incubados até fase estacionária tardia e o número de células de cada linhagem determinado. Neste caso, a hipótese a ser testada é se a linhagem selvagem apresenta melhor invasão e sobrevivência do que os mutantes quando submetidas a esta condição adversa.

A adesão celular é a primeira etapa para a invasão e colonização da célula do hospedeiro (Lu *et al.*, 1999). Quando testada a capacidade de adesão em células HeLa, não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens mutantes e selvagens, verificando-se que ambas são igualmente capazes de aderir nesta linhagem celular.

Foi avaliada a capacidade de invasão de células não fagocitárias pelas linhagens mutantes e selvagens. Foram utilizadas as linhagens celulares HeLa e HEp-2 e os mutantes STi607 $\Delta$ *himA*, STi607 $\Delta$ *himD*, ST662 $\Delta$ *himA* e ST662 $\Delta$ *himD*, no entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em termos de invasão entre as linhagens mutantes e selvagens. Os mutantes STi607 $\Delta$ *himA*, STi607 $\Delta$ *himD*, ST662 $\Delta$ *himA* e ST662 $\Delta$ *himD* não tiveram a capacidade de invasão nestas células afetadas, um aspecto extremamente importante no que tange a utilização desses mutantes para carrear antígenos que requerem processamento intra-celular para a indução de uma resposta imune efetiva.

Sobreviver no interior de macrófagos requer que a bactéria adapte-se a uma série de reações adversas incluindo o estresse oxidativo, ácido e a ação de peptídeos catiônicos, denominados defensinas (revisado por Marshall *et al.*, 2000). A capacidade das linhagens mutantes de sobreviverem em células do sistema imune, particularmente células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, é uma característica importante e desejável para uma linhagem vacinal (Loessner *et al.*, 2007). Desta forma, a capacidade de sobrevivência dos mutantes no ambiente intracelular foi avaliada utilizando a linhagem de macrófagos J774A.1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) e após 2 e 4 horas de infecção não foram observadas diferenças significativas em termos de CFU entre as linhagens mutantes e suas respectivas selvagens. A capacidade de sobreviver dentro dessas células animais é muito importante para uma efetiva colonização de *S. enterica* e um efetivo estímulo do sistema imunológico (Husseini Henzel, 2005).

Novamente, os resultados de invasão e sobrevivência intracelular obtidos neste estudo são diferentes dos relatados por Mangan *et al.* (2006) Essas diferenças são provavelmente devidas aos tipos de culturas celulares utilizados. Estes últimos autores utilizaram as linhagens celulares CHO e CACO-2.

De forma coletiva, os resultados obtidos com os testes fenotípicos demonstram que as linhagens construídas neste trabalho não apresentam grandes diferenças em relação às suas respectivas selvagens em termos de invasão e sobrevivência *in vivo* e *in vitro*.

Um aspecto testado que dá a essas linhagens um grande potencial de uso como vetor vacinal é a sua atenuação quanto à virulência. Quando ministradas pela via intraperitoneal, as linhagens mutantes para o gene *himA* apresentaram aumento da DL<sub>50</sub> de aproximadamente 2 logs em CFU em relação a linhagem selvagem, enquanto *himD* apresentaram aumento de 3 logs. A atenuação torna-se ainda mais significativa quando as linhagens são ministradas por via oral. No entanto, não foi estabelecida a DL<sub>50</sub> das linhagens mutantes por esta via, uma vez que mesmo altas doses de células não levaram os animais à morte no modelo murino. Durante o experimento de DL<sub>50</sub> por via oral, mudanças comportamentais nos animais, compatíveis com sinais e sintomas de bacteremia, tais como prostração e arrepiamento dos pelos, indicaram a ocorrência de disseminação sistêmica das linhagens atenuadas quando ministradas doses acima de 10<sup>7</sup> CFU, porém o quadro era revertido no prazo máximo de 48 horas.

Os resultados de DL<sub>50</sub>, seja por via oral ou intraperitoneal, demonstraram de forma inequívoca que os mutantes de *S. enterica* apresentaram significativa atenuação da virulência, sendo que a atenuação por via oral aumentou em mais de 4 logs a DL<sub>50</sub> dos mutantes *himA* e em cerca de 5 logs nos mutantes *himD*.

Os resultados obtidos com os experimentos de caracterização das linhagens mutantes sugeriam um grande potencial para o uso como vetores vacinais. No entanto, a capacidade de gerar resposta imune é um fator crucial para tanto. O número de doses requeridas para uma vacinação efetiva é um fator muito importante para determinar a eficiência de uma vacina (Negi *et al.*, 2007).

Experimentos preliminares demonstraram que animais imunizados com duas doses sub-letais, via intra-peritoneal, apresentaram 100% de sobrevivência quando desafiados com doses letais das linhagens selvagens. Esses valores indicam que as linhagens mutantes para os genes *himA* e *himD* são de fato imunogênicas quando ministradas via intraperitoneal.

Quando testadas pela via mais comum de infecção, a via oral, animais imunizados com apenas uma dose das linhagens STi607 $\Delta$ *himA*, STi607 $\Delta$ *himD*, ST662 $\Delta$ *himA* e ST662 $\Delta$ *himD* foram capazes de gerar uma resposta imune satisfatória, protegendo 100% dos animais desafiados com doses letais das linhagens selvagens. Experimentos com maior número de animais são necessários para melhor caracterizar o potencial vacinal das linhagens desenvolvidas neste estudo.

Nosso grupo vem trabalhando há algum tempo com a expressão de antígenos em linhagens vacinais de *S. enterica* (Brocchi *et al.*, 1999; Covone *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2007). Até o momento, nossos estudos utilizavam linhagens vacinais de *S. enterica* previamente desenvolvidas por grupos estrangeiros. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que nossa hipótese inicial sobre a atenuação da virulência e imunogenicidade de linhagens mutantes *himA* e *himD* de *S. enterica* estava correta. Nossos resultados apontam que tais mutantes são potenciais linhagens vacinais que podem e devem ser exploradas quanto ao potencial uso no desenvolvimento de novas formulações vacinais de uso humano e/ou veterinário. Nossos dados também apontam a importância da variabilidade genética na resposta bacteriana a diferentes condições de estresse e estímulos ambientais e sugerem que o desenvolvimento de uma boa linhagem vacinal inicia-se com a escolha de uma linhagem selvagem apresentando características apropriadas para tal. Certamente, o estudo do efeito de mutações introduzidas no genoma bacteriano deve ser avaliado em ao menos duas linhagens diferentes.

## **6- CONCLUSÃO**



- 1- Mutantes de *S. enterica* nulos para os genes *himA* e *himD* são atenuados quanto à virulência e imunogênicos em camundongos.
- 2- O sistema de recombinação homóloga construído por Datsenko e Wanner (2000) demonstrou-se uma ferramenta muito importante em biologia molecular, no entanto seu uso não é trivial para a utilização com a maioria dos microrganismos, necessitando de diversas adaptações.
- 3- Mutações idênticas tanto em *himA* como em *himD* apresentaram características diferentes entre as sorovarietades *S. enterica* I 4,[5],12:i:- e *S. enterica* Typhimurium. Estudos mais aprofundados com esses mutantes devem ser feitos a fim de melhor entendimento da sorovariedade *S. enterica* I 4,[5],12:i:-.
- 4- STi607 $\Delta$ *himA*, STi607 $\Delta$ *himD*, ST662 $\Delta$ *himA* e ST662 $\Delta$ *himD* demonstraram-se imunogênicas mesmo com uma única dose de imunização, porém a resposta com outras doses ainda deve ser estudada.
- 5- As linhagens mutantes de *S. enterica* por nós construídas, apesar de uma caracterização bastante inicial para fins de desenvolvimento de um vetor vacinal, apresentaram excelentes resultados. Novos ensaios de imunização e caracterização devem ser seguidos e novos modelos animais testados, com excelentes perspectivas.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ALI B.M.; BRASLAVSKY I.; OPPENHEIM A.B.; GILEADI O.; STAVANS J. Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.10658–10663. 2001.

ATKINS, H.S.; MORTON, M.; GRIFFIN, K.F.; STOKES, M.G.; NATARO, J.P.; TITBALL, R.W. Recombinant Salmonella vaccines for biodefence. **Vaccine**, v.24, p.2710. 2006.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. **Current Protocols in Molecular Biology**. 2<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons. 2003. 600p.

BOYD, E.F.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S.; SELANDERERN, R.K. Molecular genetic relationships of Salmonellae. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, p.804-808,1996.

BROCCHI, M.; COVONE, M.G.; PALLA, E.; GALEOTTI C.L. Integration of Minitransposon for Expression of yhe Escherichia Coli elt gene at a preferred site in Salmonella typhimurium identifies a Novel Putative Fimbrial Locus. **Archives of Microbiology**, v.171, n.2, p.122-26,1999.

CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J.D. Oral immunization using live attenuated Salmonella spp. as carriers of foreign antigens. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.5, p.328-342, 1992.

CHEMINAY, C.; HENSEL, M. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. **Int. J Med. Microbiol.** v.298, n.1-2, 2007.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 6.ed. Approved Standard. 2005.

COVONE, M.G.; BROCCHI, M.; PALLA, E.; DA SILVEIRA, W. D.; RAPPUOLI, R.; GALEOTTI, C.L. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. **Infect Immun.**, v.66, p.224-231, 1998.

CRÓINÍN, T. Ó.; DORMAN, C.J. Expression of the Fis protein is sustained in late-exponential- and stationary-phase cultures of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium grown in the absence of aeration. **Molecular Microbiology**, v.66, n.1, p.237–251, 2007.

CURTISS, R, 3<sup>RD</sup>; GALAN, J.E.; NAKAYAMA, K.; KELLY, S.M. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. **Res Microbiol.**, v.141, n.7-8, p.797-805, 1990.

DATSENKO, K.A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.; **Harvard Medical School**, v.11, 2000.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of Salmonella with the Intestinal Mucosa. **Clin. Microbiol. Review.** v.12, n.3, p.405–428, 1999.

DE GROOTE, M.A.; TESTERMAN, T.; XU, Y.; STAUFFER, G.; FANG, F.C. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium*. **Science.** v.272, p.414-417, 1996.

DRLICA, K.; ROUVIERE-YANIV, J. Histone-like proteins of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v.51, p.301-319, 1987.

DUNSTAN, S.J.; SIMMONS, C.P.; STRUGNELL, R.A. In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. **Immunol. Med. Microbiol.**, V.186, p.240-245, 2003.

EVEREST, P.; FRANKEL, G.; LI, J.; LUND, P.; CHATFIELD, S.; DOUGAN, G. Expression of LacZ from the *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in a *Salmonella* vaccine strain: influence of growth in mammalian cells. **Microbiol. Lett.**, v.37, p.111-119, 1995.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; DIAS, A.M.; ALMEIDA, I.A.; MELO L.C. *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v.48. n.4, p.179-184, 2006.

FIELDS, P.I.; SWANSON, R.V.; HAIDARIS, C.G.; HEFFRON, F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v.14, p.5189-5193, 1986.

FIGUEROA-BOSSI, N.; UZZAU, S.; MALORIOL, D.; BOSSI, L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. **Mol. Microbiol.** V.39, p.260-271, 2001.

GERLACH, R.G.; JÄCKEL, D.; STECHER, B.; WAGNER, C.; LUPAS, A.; HARDT, W.D.; HENSEL, M. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. **Cellular Microbiology**, v.9, n.7, p.1834–1850, 2007.

GERMANIER, R.; FÜRER, E.; Characteristics of the attenuated oral vaccine strain "*S. typhi*" Ty 21a. **Dev. Biol. Stand.**, v.53, p.3-7, 1983.

GHILARDI, Â.C.R.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil . **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.3, p.281-286, 2006.

GOOSEN, N.; VAN DE PUTTE, P. The regulation of transcription initiation by integration host factor. **Mol. Microbiol.** v.16, p.1–7, 1995.

GUERRA, B.; LACONCHA, I.; SOTO, S.M.; GONZÁLEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i: ] organisms causing human salmonellosis. **Microbiol. Lett.**, v.190, p.341-47. 2000.

GUZMAN, C.A.; BORSUTZKY, S.; GRIOT-WENK, M.; METCALFE, I.C.; PEARMAN, J.; COLLIOD, A.; FAVRE, D.; DIETRICH, G. Vaccines against typhoid fever. **Vaccine**, v.24, p.3804-3811, 2006.

HENDERSON, I.R.; OWEN, P.; NATARO, J.P. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. **Molecular Microbiology**. v.33, n.5, p.919-932, 1999.

HO, T.D.; SLAUCH, J.M. Characterization of *grvA*, an Antivirulence Gene on the Gifsy-2 Phage in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.2, p.611-620, 2001.

HOHMANN, E.L.; OLETTA, C.A.; KILLEEN, K.P.; MILLER, S.I. *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. **J. Infect. Dis.**, v.173, p.1408-1414, 1996.

HOFER, E.; DOS REIS, E.M. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.36, n.1, p.7-9, 1994.

HONE, D.; ATTRIDGE, S.; VAN DEN BOSCH, L.; HACKETT, J. A chromosomal integration system for stabilisation of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. **Microb. Pathog.**,v.5, p.407-418, 1988.

HUSSEINY, M.I.; HENZEL, M.. Rapid Method for Construction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurim Vaccine Carrier Strains. **Infection and Immunity**, v.73, n.3, p.1598-1605, 2005

IKEDA, J. S.; SCHMITT, C. K.; DARNELL, S. C.; WATSON, P. R.; BISPHAM, J.; WALLIS, T. S.; WEINSTEIN, D. L.; METCALF, E. S.; ADAMS, P.; O'CONNOR, C. D.; O'BRIEN, A. D. Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. **Infection and Immunity**, v.69, n.5, p.3021-3030, 2001.

ISHIHAMA, A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Annu. Rev. Microbiol.** V.54, p.499-518, 2000.

JONES, B.D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **J. Exp. Med.** V.180, p.15-23. 1994.

KAUFMANN, F. Das Fundament (**Munksgaard**, Copenhagen). 1978.

KWON, Y.M.; COX, M.M.; CALHOUN, L.N. *Salmonella*-based vaccines for infectious diseases. **Expert Rev. Vaccines**, v.6, p.147-152, 2007.

LOESSNER, H.; ENDMANN, A.; LESCHNER, S.; BAUER, H.; ZELMER, A.; ZUR, L. S.; WESTPHAL, K.; WEISS, S. Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. **Int. J. Med. Microbiol.** *In press*, 2007.

LORENZ, M.; HILLISCH, A.; GOODMAN, S.D.; DIEKMANN, S. Global structure similarities of intact and nicked DNA complexed with IHF measured in solution by fluorescence resonance energy transfer. **Nucleic Acids Res.** v.27, p.4619–4625, 1999.

LU, S.; MANGES, AR; XU, Y; FANG, F.C.; RILEY, L.W. Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella enteritidis* *in vivo* and *in vitro*. **Infect. Immun.** v.67, p.5651-5657, 1999.

LU, S.; MANGES, A.R.; XU, Y.; FANG, F.C.; RILEY, L.W. The Global Regulator ArcA Controls Resistance to Reactive Nitrogen and Oxygen Intermediates in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Infect. Immun.**, v.70, n.2., p.451–461, 2002.

LY, K.T.; CASANOVA, J.E.; Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. **Cellular Microbiology**, v.9, n.9, p.2103–2111, 2007.

MAHONEY, R.T.; KRATTIGER, A.; CLEMENS, J.D.; CURTISS, R. 3<sup>rd</sup>. The introduction of new vaccines into developing countries. **Vaccine**. v.25, p.4003-4011, 2007.

MANGAN, M.W.; LUCCHINI, S.; DANINO, V. CRÓINÍN, T.O.; HINTON, J.C.D.; DORMAN, C.J. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v.59, n.6, p.1831–1847, 2006

MARSHALL, D.G.; HAQUE, A.; FOWLER, R.; DEL GUIDICE, G.; DORMAN, C.J.; DOUGLAS, G.; BOWE, F. Use of the stationary phase inducible promoters, *spv* and *dps*, to drive heterologous antigen expression in *Salmonella* vaccine strains. **Vaccine**. v.18, n.14, p.1298-1306, 2000.

MASTROENI, P.; MASKELL, D. ***Salmonella* infections: Clinical, immunological and molecular aspects**. 1° ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2006.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L. ; DIERTZ, V.; MCCRAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illnesses and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**. v.5, p.607-625, 1999

MERIGHI, M.; ELLERMEIER. C.D.;SLAUCH, J.M.;GUNN, J.S. Resolvase-*In Vivo* Expression Technology Analysis of the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium PhoP and PmrA Regulons in BALB/c Mice. **J. Bacteriol.** , v.187, n.21, p.7407–7416, 2005.

MIZUNO, T.; PLOEG, R.; TROTT, D. A new concept to stimulate mucosal as well as systemic immunity by parenteral vaccination as applied to the development of a live attenuated *Salmonella enterica* serovar Dublin vaccine. **Vet. Res.** v.38, p.773–794, 2007.

MOLLENKOPF, H.; DIETRICH, G.; KAUFMANN, S.H. Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination. **Biol. Chem.**, v.382, p.521–532, 2001.

NAKAZATO, G.; **Estudo dos Fatores de Virulência de Amostras de *Escherichia coli* Patogênicas De Origem Aviária (Apec)**. 106p. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006

NEGI, G.D.; SINGHAMAHAPATRA, S.; CHAKRAVORTTY, D. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain lacking pmrG-HM-D provides excellent protection against salmonellosis in murine typhoid model. **Vaccine**, v.25, p.5315–5323, 2007.

OLIVEIRA, A.F.; FERRAZ, L.C.; BROCCHI, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. **Microbes and Infection**, v.9, n.3, p.382-390, 2007

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.155, n.7, p.568-70, 2004.



SALEHI, T.Z.; TADJBAKHS, H.; ATASHPARVAR, N.; NADALIAN, M. G.; MAHZOUNIEH, M.R. Detection and Identification of *Salmonella Typhimurium* in Bovine Diarrhoeic Fecal Samples by Immunomagnetic Separation and Multiplex PCR Assay.; **Zoonoses and Public Health.**, v.54, n.6-7. p.231-236, 2007.

SALES, A.I.L. **Traçando as origens de amostras monofásicas de *Salmonella enterica* I4, [5],12i.-: similaridade genética com *Salmonella enterica* Typhimurium.** 2002, 109p., Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SALES, A.I.L. **Caracterizações fenotípicas e genotípicas de amostras monofásicas de *S. enterica* i 4,[5],12:i:-**, 2007., 123p. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SALYERS, A.A. E.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach.** 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press, Washington, DC, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**, N. Y., 2001, 2444p.

SANO, G.; TAKADA, Y.; GOTO, S.; MARUYAMA, K.; SHINDO, Y.; OKA, K.; MATSUI, H.; MATSUO, K. Flagella facilitate escape of salmonella from oncotic macrophages. **J. Bacteriol.**, v.189, n.22, p.8224-8232., nov. 2007

SANSONETTI, P.J.; RYTER, A.; CLERC, P.; MAURELLI, A.T.; MOUNIER, J. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. **Infect. Immun.**, v.51, p.461-469, 1986.

SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; ZHANG, S.; FICHT, T.A.; BAUMLER, A.J.; ADAMS, L.G. Salmonella-induced cell death is not required for enteritis in calves. **Infection and Immunity**, v.69, n.7, p.4610-4617, 2001.

SCALETSKY, I.C.A.; SILVA, M.I.M.; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.** v.45, p.534-536, 1984.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, p.2959-2965, 2004.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; MCVEY, S. E.; CHENGAPPA, M.M. Detection of *Salmonella* Serovars from Clinical Samples by Enrichment Broth Cultivation-PCR Procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p.1742-49, 1994.

STRUGNELL, R. A.; MASKELL, D.; FAIRWEATHER, N.; PICKARD, D.; COCKAYNE, A.; PENN, C.; DOUGAN, G. Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *Salmonella typhimurium* vaccine strains. **Gene**. v.88, p.57-63. 1990.

STUEHR, D.J.; NATHAN, C.F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.**, v.169, p.1543-55, 1989.

THANBICHLER, M.; WANG, .S.C.; SHAPIRO. L. The Bacterial Nucleoid: A Highly Organized and Dynamic Structure. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.96, p.506-521, 2005.

TACKET, C.O.; SZTEIN, M.B.; LOSONSKY, G.A.; WASSERMAN, S.S.; NATARO, J.P.; EDELMAN, R.; PICKARD, D.; DOUGAN, G.; CHATFIELD, S.N.; LEVINE, M.M. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune response in humans. **Infect. Immun.**, v.65, p.452-456, 1997.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M.; IRINA. K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.119-127, 1996.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINA, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: Increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.38(5), p.315-22.1996.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; FERNANDES, B. C. "*Multiplex PCR*" identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- in Sao Paulo State, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.2, p.115-117, 2004.

TAYLOR, T. W. J.; WIGNALL, E. W.; COWLEY, J. F. The decomposition of nitrous acid in aqueous solutions. **J. Chem. Soc.**, v.11, p.1923, 1927.

VASCONCELOS, A.T.R.; *et al.* Swine and Poultry Pathogens: the Complete Genome Sequences of Two Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a Strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, August, v. 187, n.16, p. 5568-5577, 2005.

WELKOS, S.; O'BRIEN, A. Determination of median lethal and infectious doses in animal model systems. **Methods Enzymol.**, v.35, p.9-39, 994.

