



TAMIRES FERNANDA VILAS BOAS CORDEIRO

**“CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES DE *Salmonella enterica*
TYPHIMURIUM PARA GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS LIGANTES DE
DNA: AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS”**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TAMIRES FERNANDA VILAS BOAS CORDEIRO

“CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES DE *Salmonella enterica* TYPHIMURIUM PARA GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS LIGANTES DE DNA: AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS”

Este exemplar corresponde à redação final da DISSERTAÇÃO defendida pela candidata

**TAMIRES FERNANDA
VILAS BOAS CORDEIRO**

e aprovada pela Comissão Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C811c Cordeiro, Tamires Fernanda Vilas Boas, 1987-
Construção de linhagens mutantes de *Salmonella enterica* Typhimurium para genes codificadores de proteínas ligantes de DNA : avaliação de características fenotípicas / Tamires Fernanda Vilas Boas Cordeiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Salmonella enterica*. 2. Proteínas de ligação a DNA. 3. Vacinas contra *Salmonella*. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Construction of mutant strains of *Salmonella enterica* Typhimurium for genes encoding DNA-binding proteins : evaluation of phenotypic characteristics

Palavras-chave em inglês:

Salmonella enterica

DNA-binding proteins

Salmonella vaccines

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Cristina Elisa Alvarez Martinez

Regina Lúcia Baldini

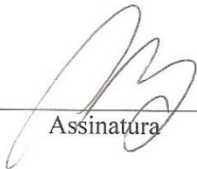
Data de defesa: 14-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

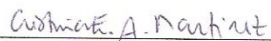
Campinas, 14 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez


Assinatura

Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini


Assinatura

Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio De Mendonça

Assinatura

RESUMO

Salmonella enterica é um dos patógenos de origem alimentar mais prevalente. É uma bactéria gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, intracelular facultativa, não formadora de esporo, anaeróbia facultativa, capaz de infectar animais incluindo o homem. Geralmente é adquirida por meio de alimentos contaminados com tal micro-organismo e pode causar em humanos gastroenterite e bacteremia. O presente trabalho propõe a construção de linhagens mutantes de *S. enterica* Typhimurium para genes codificadores de proteínas associadas ao nucleóide (NAPs – *Nucleoid-Associated Proteins*). Tais proteínas auxiliam no enovelamento do DNA, permitindo que o cromossomo bacteriano seja compactado, além disso também influenciam na regulação transcricional de genes, em especial daqueles que respondem a mudanças ambientais. As NAPs são numerosas e o estudo desse grupo é bastante importante, pois vários esclarecimentos ainda precisam ser feitos a respeito de grande parte dessas proteínas. Dados recentes do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que mutantes nulos de *S. enterica* Typhimurium para genes codificadores de NAPs são atenuados quanto à virulência e capazes de induzir proteção no modelo murino de infecção. Esses resultados demonstram o importante papel de tais proteínas na virulência bacteriana. Assim, o presente estudo tem como objetivo a construção de mutantes nulos para dois genes codificadores de NAPs (*stpA* e *ybaB*) em *S. enterica* Typhimurium e a avaliação do fenótipo desses mutantes. Não há dados na literatura sobre o papel de tais NAPs com relação à virulência bacteriana. No caso de YbaB, não existem dados na literatura sobre o papel desta NAP em enterobactérias. Foi utilizado o sistema de recombinação λ Red para obtenção dos mutantes. Para observação do fenótipo de tais linhagens, foram feitos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados observados nos experimentos *in vitro* mostram fenótipos interessantes das linhagens mutantes em comparação com as respectivas linhagens selvagens. No caso da mutação Δ *stpA*, foi observada maior sobrevivência de células com essa deleção a certas situações de estresse em comparação com a linhagem selvagem. Já para a mutação Δ *ybaB*, nossos ensaios de motilidade sugerem que a deleção desse gene teve efeito sobre a motilidade das células mutantes. Quanto à virulência dos mutantes construídos, tais mutações não afetaram a patogenicidade de *S. enterica* de modo considerável. Assim, as linhagens mutantes obtidas no presente trabalho não apresentam potencial de serem aplicadas como vacinas, mas lançam perspectivas para estudos futuros a respeito do papel biológico de YbaB em *S. enterica*.

Palavras-Chave: *Salmonella enterica*, Proteínas de ligação a DNA, Vacinas contra *Salmonella*.

ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the most prevalent foodborne pathogens. It is a gram-negative bacterium, belonging to the Enterobacteriaceae family, intracellular facultative, non-spore forming, anaerobic facultative, capable of infecting animals, including man. It's usually acquired through foods contaminated with such microorganism and can cause gastroenteritis and bacteremia in humans. This study proposes the construction of mutant strains of *S. enterica* Typhimurium for genes encoding nucleoid-associated proteins (NAPs). These proteins help on folding of DNA, allowing the bacterial chromosome to be compressed, also influencing the transcriptional regulation of genes, especially those that respond to environmental changes. The NAPs are numerous and the study of this group is very important, because several explanations still have to be made regarding most of these proteins. Recent data from our research group has shown that null mutants of *S. enterica* Typhimurium for genes encoding NAPs are attenuated for virulence and capable of inducing protection in a murine model of infection. These results demonstrate the important role of these proteins in bacterial virulence. Thus, the present study aims at the construction of null mutants for two genes encoding NAPs (*stpA* and *ybaB*) in *S. enterica* Typhimurium and at the evaluation of the phenotype of these mutants. There are no data in the literature about the role of such NAPs regarding bacterial virulence. For the YbaB, there are no data in the literature about the role of this NAP in enterobacteria. The λ Red recombination system was used to obtain the mutants. For observation of the phenotype of such strains, *in vitro* and *in vivo* experiments were performed. The results obtained in *in vitro* experiments showed interesting phenotypes of mutant strains compared to their wild-type strains. In the case of Δ *stpA* mutation, increased cell survival was observed on certain stress situations compared to the wild-type strain. For the Δ *ybaB* mutation, our studies suggest that deletion of this gene had effect on motility of mutant cells. For virulence of the constructed mutants, these mutations did not affect the pathogenicity of *S. enterica* considerably. Thus, the mutant strains obtained in this study have no potential to be applied as vaccines, but this work provides prospects for future studies on the biological role of YbaB in *S. enterica*.

Keywords: *Salmonella enterica*, DNA-binding proteins, *Salmonella* vaccines.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Salmonelose	1
1.2. Patogenicidade de <i>S. enterica</i> Typhimurium	4
1.3. <i>Salmonella</i> e vacinas.....	7
1.4. Proteínas associadas ao nucleóide bacteriano	8
1.5. Sistema λ Red e deleção gênica.....	13
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Geral	17
3.2. Específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Linhagens Bacterianas	19
4.2. Meios de cultura e armazenamento das linhagens bacterianas	19
4.3. Plasmídeos.....	20
4.4. Animais	21
4.5. Construção de mutantes de <i>S. enterica</i>	22
4.5.1. Preparo de células eletrocompetentes.....	22
4.5.2. Transformação de células eletrocompetentes com o plasmídeo pKD46	24
4.5.3. Obtenção do cassete de recombinação por PCR	24
4.5.4. Transformação de células eletrocompetentes com produtos de PCR.....	26
4.5.5. Confirmação da deleção gênica	27
4.5.6. Transdução	28
4.5.7. Eliminação do gene de resistência.....	31
4.6. Caracterização fenotípica dos mutantes de <i>S. enterica in vitro</i>	32
4.6.1. Curvas de Crescimento	32
4.6.2. Sobrevivência sob estresse nutricional	33
4.6.3. Sobrevivência em meio com adição de sais biliares	34
4.6.4. Ensaio de Motilidade	34
4.7. Caracterização da virulência dos mutantes de <i>S. enterica in vivo</i>	35

4.8. Análises estatísticas	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Construção dos mutantes	37
5.2. Caracterização fenotípica dos mutantes <i>in vitro</i>	43
5.2.1. Curvas de Crescimento	44
5.2.2. Sobrevivência sob estresse nutricional	49
5.2.3. Sobrevivência em meio com adição de sais biliares	50
5.2.4. Ensaio de Motilidade	55
5.3. Caracterização fenotípica dos mutantes de <i>S. enterica in vivo</i>	58
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9. ANEXOS.....	81
9.1. Anexo 1	81
9.2. Anexo 2.....	84

"Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning."

Albert Einstein

Dedico este trabalho aos meus pais, Devanir Cordeiro e Miriam Vilas Boas Cordeiro, fonte de amor e apoio em todos os momentos e situações...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e educação que ofereceram a mim e meus irmãos. Serei sempre grata pela oportunidade que me deram de escolher o meu caminho e buscar meus sonhos. Obrigada por tudo!

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Marcelo Brocchi por ter me dado a chance de fazer parte de seu grupo de pesquisa quando eu me encontrava em meio a tantas dúvidas. Agradeço por todas as discussões científicas, conselhos e confiança sempre.

Ao meu amigo e amor Ederson Rocha Ribeiro por todos os dias de companhia, de conversas, choro e risos (e põe risos nisso!) durante todo o meu mestrado. Você, benzinho, acompanhou todos os meus medos, conquistas e dramas ao longo desse período. Muito obrigada!

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de estudar nessa Universidade.

Às agências de fomento, Capes e Fapesp (Processo 2012 / 05308-0), pelos recursos e bolsas de estudo concedidas.

À Dra. Mônica Barbosa de Melo, por ter aberto as portas da Unicamp para mim. Agradeço também ao seu grupo de pesquisa que me acolheu e que me permitiu conhecer pessoas tão especiais como Pedro Cruz e Gislene Pereira Gil.

Aos laboratórios da Unicamp que permitiram que alguns experimentos fossem realizados, em especial à Profa. Selma Giorgio e sua aluna Myriam Salazar, e também ao Prof. Wanderley Dias da Silveira e à Dra. Thaís Cabrera Galvão Rojas, pelas colaborações estabelecidas.

À Comissão de Pós-Graduação da Unicamp pela oportunidade de ter participado do Programa de Estágio Docente (PED).

Aos docentes que participaram do meu Exame de Qualificação e Banca Prévia, Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão, Profa. Dra. Isabel Cristina Affonso Scaletsky e Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga, contribuindo com sugestões para a realização do presente trabalho.

Aos professores das disciplinas que cursei durante o mestrado, pelos ensinamentos e experiências vividas que, com certeza, contribuíram para minha formação profissional.

Aos colegas de disciplinas, pela parceria nos trabalhos e discussões, em especial ao Elton Melo, Daiane Belgini, Maicon Passini, Carol Ascensão e Beatriz Temer.

À amiga querida que adquiri, Bárbara Codonho. Você foi meu primeiro contato em Campinas e tornou-se realmente uma amiga. Muito obrigada pelos abraços que me encheram de conforto nos momentos de tensão e também pelas risadas tão gostosas que saem quando estamos juntas!

Ao apoio técnico do Evandro e Sandra Martins. Sem vocês, fica difícil trabalhar, obrigada. Também aos demais funcionários que conheci, técnicos de outros laboratórios, faxineiras, secretárias.

Aos meus companheiros de laboratório pela rotina diária de trabalho: Adriane Sprogis, Aline Parolin, Ana Cauz, Bruna Leite, Camila, Catierine, Guilherme, Meiriele e Marina. Um agradecimento especial à Bruna de Araújo Lima pelo auxílio constante em diversos aspectos. Também à Meire Ota pela amizade e ajuda em muitas situações. Finalmente ao Diego Borin Nóbrega pela disposição em sempre ajudar com as análises estatísticas.

Aos alunos de Iniciação Científica, Fernanda Luz Paulino da Costa e Fabio Floresta. Vocês sabem o quanto me ajudaram! Fer, precisamos retomar aqueles cafés pré-curva de crescimento... Muito obrigada!

Aos que já finalizaram seus trabalhos no laboratório e com os quais pude conviver um pouquinho, Camila Baldo, Marcela Medici, Marcos Moraes e Jéssica Gosse.

Às amigas de infância e pra vida toda, Aline Bragiatto e Carol Bragiatto, por estarem sempre comigo, mesmo estando tão longe.

Aos amigos Ibilceanos, entre eles, Cássia, Maysa, Vivian, Renata e Mário pela amizade “desde sempre”.

Às pessoas especiais que conheci nestes últimos dois anos e que tornaram meus dias em Campinas mais agradáveis e felizes. Obrigada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do plasmídeo pKD46, utilizado no presente trabalho.....	13
Figura 2. Representação esquemática da estratégia utilizada no presente trabalho para construção dos mutantes $\Delta stpA$ e $\Delta ybaB$	23
Figura 3. Placas com meio <i>Mint Green</i>	31
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a amplificação dos cassetes de recombinação a partir do plasmídeo pKD3.....	38
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando os cassetes de recombinação, após etapa de purificação.....	38
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene <i>ybaB</i> . Os iniciadores utilizados nesta reação de PCR foram ybaBDT-F e ybaBDT-R.....	39
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene <i>stpA</i> . Os iniciadores utilizados nesta reação de PCR foram stpADT-F e stpADT-R.....	39
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene <i>ybaB</i> após transdução, nas duas linhagens, 607STi e 662STm.....	40
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene <i>stpA</i> após transdução, nas duas linhagens, 607STi e 662STm.....	40
Figura 10. Placas de meio <i>Mint Green</i> inoculadas com as linhagens: A. 607STi WT; B. 607STi $\Delta ybaB::cat$; C. 662STm WT; D. 662STm $\Delta ybaB::cat$ e E. 662STm $\Delta stpA::cat$	41
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene que confere resistência ao cloranfenicol (<i>cat</i>) nas linhagens mutantes 607STi $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta ybaB$	42
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene que confere resistência ao cloranfenicol (<i>cat</i>) na linhagem mutante 662STm $\Delta stpA$	43
Figura 13. Curvas de crescimento das linhagens 662STm WT e 662STm $\Delta ybaB$ durante 12 horas.....	45
Figura 14. Curvas de crescimento das linhagens 662STm WT e 662STm $\Delta stpA$ durante 12 horas.....	46
Figura 15. Curvas de crescimento das linhagens 607STi WT e 607STi $\Delta ybaB$ durante 12 horas.....	47

Figura 16. Curvas de crescimento das linhagens 607STi WT e 607STi <i>ΔstpA::cat</i> durante 12 horas.....	48
Figura 17. Culturas 662STm WT, 662STm <i>ΔybaB</i> e 662STm <i>ΔstpA</i> inoculadas em meio mínimo M9 ao final dos cinco dias de experimento.....	50
Figura 18. Crescimento das linhagens 662STm WT e 662STm <i>ΔybaB</i> durante 7 horas em meio LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares.....	51
Figura 19. Crescimento das linhagens 662STm WT e 662STm <i>ΔstpA</i> durante 7 horas em meio LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares.....	52
Figura 20. Crescimento das linhagens 607STi WT e 607STi <i>ΔybaB</i> durante 7 horas em meio LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares.....	53
Figura 21. Crescimento das linhagens 607STi WT e 607STi <i>ΔstpA::cat</i> durante 7 horas em meio LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares.....	54
Figura 22. Culturas representativas da migração de <i>S. enterica</i> em meio semi-sólido para avaliação da motilidade. As culturas foram incubadas 12 horas antes da medição do diâmetro dos halos. A. Placa inoculada com a linhagem 662STm WT. B. Placa inoculada com a linhagem 662STm <i>ΔybaB</i>	56
Figura 23. Culturas representativas da migração de <i>S. enterica</i> em meio semi-sólido para avaliação da motilidade. As culturas foram incubadas 12 horas antes da medição do diâmetro dos halos. A. Placa inoculada com a linhagem 607STi WT. B. Placa inoculada com a linhagem 607STi <i>ΔybaB</i>	57
Figura 24. Culturas representativas da migração de <i>S. enterica</i> em meio semi-sólido para avaliação da motilidade. As culturas foram incubadas 12 horas antes da medição do diâmetro dos halos. A. Placa inoculada com a linhagem 607STi WT. B. Placa inoculada com a linhagem 607STi <i>ΔstpA::cat</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas associadas ao nucleóide (NAPs) de bactérias gram-negativas. Adaptada de Dillon e Dorman (2010).....	10
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>cat</i> (Cloranfenicol Acetil Transferase).....	25
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção da deleção dos genes <i>stpA</i> e <i>ybaB</i> em <i>S. enterica</i>	27
Tabela 4. Contagem de UFC/mL das linhagens 662STm WT, 662STm $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta stpA$ sob estresse nutricional em intervalos de 24 horas durante cinco dias de incubação. O cultivo foi realizado em meio mínimo M9.....	50
Tabela 5. Medidas em milímetros do halo de migração das linhagens 662STm WT e 662STm $\Delta ybaB$ durante ensaio de motilidade.....	55
Tabela 6. Medidas em milímetros do halo de migração das linhagens 607STi WT e 607STi $\Delta ybaB$ durante ensaio de motilidade.....	57
Tabela 7. DL ₅₀ de linhagens de <i>S. enterica</i> Typhimurium 662STm WT, 662STm $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta stpA$ inoculadas via oral em camundongos BALB/c/AnUnib.....	59
Tabela 8. DL ₅₀ de linhagens de <i>S. enterica</i> 607STi WT e 607STi $\Delta ybaB$ inoculadas via oral em camundongos BALB/c/AnUnib.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

A	ABSORBÂNCIA
cm	CENTÍMETRO
ATR	<i>ACID TOLERANCE RESPONSE</i>
DL ₅₀	DOSE LETAL MÉDIA
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO
dNTP	DESOXINUCLEOTÍDEO TRIFOSFATO
DO	DENSIDADE ÓPTICA
FRT	“FLP <i>RECOGNITION SITE</i> ”
g	FORÇA g OU <i>RELATIVE CENTRIFUGAL FORCE</i> (rcf)
g	GRAMA
h	HORA
iNTS	<i>Salmonella</i> NÃO-TIFÓIDE INVASIVA
IPS	ILHAS DE PATOGENICIDADE DE <i>Salmonella</i>
Kb	KILO BASE (1000 PARES DE BASES NUCLEOTÍDICAS)
L	LITRO
LB	MEIO LURIA BERTANI
LEP	FASE EXPONENCIAL TARDIA
log	LOGARITMO NA BASE 10
LPS	LIPOPOLISSACARÍDEOS
M	MOLAR
MEP	FASE EXPONENCIAL MEDIANA
mL	MILILITRO
mm	MILÍMETRO
mM	MILIMOLAR
NAP	PROTEÍNA ASSOCIADA AO NUCLEÓIDE

ng	NANOGRAMA
nm	NANÔMETRO
NTS	<i>Salmonella</i> NÃO-TIFÓIDE
Orf	“ <i>OPEN READING FRAME</i> ”
pb	PARES DE BASES NUCLEOTÍDICAS
PBS	TAMPÃO FOSFATO SALINA
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
pmol	PICOMOL
RNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
RPM	ROTAÇÕES POR MINUTO
SCVs	<i>Salmonella-CONTAINING VACUOLES</i>
SS	MEIO <i>Salmonella-Shigella</i>
STm	<i>Salmonella enterica</i> TYPHIMURIUM
STi	<i>Salmonella enterica</i> I 4, [5], 12:i:-
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	UNIDADES
UFC	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA
UFP	UNIDADE FORMADORA DE PLACA DE LISE
WT	WILD TYPE
µg	MICROGRAMA
µL	MICROLITRO
µm	MICRÔMETRO
µM	MICROMOLAR
°C	GRAU CELSIUS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Salmonelose

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e contém duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. *S. enterica* divide-se em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (MASTROENI e MASKELL, 2006). Mais de 2.600 sorovares de *S. enterica* foram identificados com base na reação de anticorpos contra antígenos bacterianos somáticos (O) e flagelares (H) (STEVENS *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2014). A maioria das infecções em humanos é causada por um número limitado de sorovares, tais como *S. enterica* sorovariedades Enteritidis e Typhimurium (JONES *et al.*, 2008; KISS *et al.*, 2012).

Salmonella enterica é uma bactéria gram-negativa, intracelular facultativa, não formadora de esporo, anaeróbia facultativa, capaz de infectar animais e humanos (FABREGA e VILA, 2013; SUEZ *et al.*, 2013). As infecções provocadas por *S. enterica* provocam diversas manifestações clínicas em humanos. A febre tifóide, causada por *S. enterica* sorovar Typhi (*S. Typhi*) e *S. Paratyphi A* caracteriza-se por bacteremia. Já os sorovares de *Salmonella* não-tifóide (NTS) causam principalmente diarreia, com bacteremia secundária ocasional. A bacteremia primária por sorovares NTS pode ocorrer em hospedeiros imunocomprometidos e crianças da África sub-saariana (DE JONG *et al.*, 2012).

Geralmente é adquirida por meio de alimentos contaminados com tal micro-organismo e pode causar, em humanos, gastroenterite e bacteremia (HENDRIKSEN *et al.*, 2011). Há estimativas de que aproximadamente 75% dos casos de infecção por *S. enterica* em humanos são resultantes de alimentos contaminados derivados de carne bovina, suína, frangos e ovos (HALD *et al.*, 2004). Galinhas, porcos e gados são importantes reservatórios desse micro-organismo (CHAUDHURI *et al.*, 2013). O gênero *Salmonella* apresenta relevância clínica tanto em países

desenvolvidos quanto em desenvolvimento, já que este patógeno é uma das causas mais comuns de doenças de origem alimentar em países desenvolvidos e uma das principais causas de doenças diarréicas em países em desenvolvimento (KARIUKI *et al.*, 2006; VOJDANI *et al.*, 2008; ANSARI *et al.*, 2012; KABIR *et al.*, 2012; KOZAK *et al.*, 2013).

S. enterica Typhimurium pode ser isolada a partir de frangos de corte, chocadeiras e rebanhos de poedeiras comerciais (PREJIT *et al.*, 2013). Com relação aos frangos de corte, estes podem ser infectados com *S. enterica* a qualquer momento durante o processo de produção, desde o período de crescimento ou mesmo pós-abatimento. No entanto, nos primeiros dias após a eclosão dos ovos, os filhotes são altamente suscetíveis a infecções por *S. enterica*, decorrente de contaminação ambiental (DESMIDT *et al.*, 1997). Neste período, mesmo o contato com baixo número de *S. enterica* pode resultar em infecção persistente (GAST e BENSON, 1995; VAN IMMERSEEL *et al.*, 2004). Após a infecção inicial, os frangos podem ainda ser colonizados até o momento em que atingem a idade de abate, resultando na introdução de *S. enterica* no matadouro e contaminação da carne comercializada (HEYNDRIKX *et al.*, 2002). Com o aumento da fiscalização sobre criadores de aves e gado para redução da contaminação por patógenos em carnes comercializadas, maior ênfase tem sido dada para a diminuição da contaminação por patógenos nos locais de criação desses animais (RASSCHAERT *et al.*, 2008; PAIAO *et al.*, 2013).

Cepas de *S. enterica* são as principais responsáveis por casos de gastroenterite aguda. O impacto das infecções por *S. enterica* sobre a saúde pública mundial não tem sido devidamente estimado, mas sabe-se que gastroenterites são importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (BERN *et al.*, 1992; KOSEK *et al.*, 2003). São estimados 93,8 milhões de casos

por ano de gastroenterite em humanos, no mundo todo, provocados por espécies de *S. enterica*, com 155.000 mortes (MAJOWICZ *et al.*, 2010).

De acordo com informação publicada pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), cerca de 40.000 casos de salmonelose são relatados a cada ano apenas nos Estados Unidos, apesar do número real ser, supostamente, 30 vezes maior devido à ausência de diagnóstico ou notificação de casos mais brandos. Esta doença acomete principalmente crianças menores de cinco anos, idosos e pacientes imunocomprometidos, levando à morte cerca de 400 pessoas a cada ano devido a salmonelose aguda, só nos Estados Unidos. Agentes patogênicos de origem alimentar normalmente apresentam-se na população em surtos e podem afetar um número significativo de pacientes. Vários surtos atribuídos a diferentes sorovares de *S. enterica* são relatados a cada ano, com destaque para a frequência de *S. enterica* sorovar Typhimurium e *S. enterica* sorovar Enteritidis entre os mais comuns agentes patogênicos (JAY, 2000, KARIUKI *et al.*, 2006; VOJDANI *et al.*, 2008; ANSARI *et al.*, 2012; KABIR *et al.*, 2012; KOZAK *et al.*, 2013).

No Brasil, de 1999 a 2008, foram registrados 6.602 surtos de doenças transmitidas por alimentos, sendo que dentre os que foram causados por bactérias, 43% deles tinham como agente etiológico *Salmonella* spp. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2011). Durante o período de 1996 a 2003, em diferentes regiões de todo o Estado de São Paulo, foram isoladas de humanos, 3.554 amostras de *Salmonella* classificadas em 68 sorovares diferentes (FERNANDES *et al.*, 2006).

1.2. Patogenicidade de *S. enterica* Typhimurium

S. enterica sorovar Typhimurium é um patógeno capaz de infectar humanos e animais. A infecção começa com a ingestão de água ou alimentos contaminados e então o patógeno atinge o epitélio intestinal e desencadeia doença gastrointestinal. Pode provocar desde leve a severa gastroenterite até o quadro de infecção sistêmica. A patogênese provocada por *S. enterica* Typhimurium tem sido bastante estudada ao longo dos últimos anos e o conhecimento sobre os mecanismos de virulência deste patógeno está sempre aumentando (GORDON *et al.*, 2008; FABREGA e VILA, 2013).

A compreensão dos mecanismos utilizados por bactérias para regular a expressão de genes em resposta às mudanças do ambiente é um importante objeto de estudo da microbiologia molecular moderna. De fato, *S. enterica* Typhimurium tem sido utilizada com sucesso como modelo de estudo para a patogênese bacteriana por muitos anos. Esta bactéria oferece a maioria das vantagens de *E. coli* como micro-organismo modelo, mas apresenta o diferencial de ser um patógeno cuja relação com o seu hospedeiro natural, o camundongo, é compreendida em detalhes (GRASSL e FINLAY, 2008; DORMAN, 2009).

A dose infectante média capaz de produzir infecções clínicas ou sub-clínicas em humanos está entre 10^5 a 10^{10} micro-organismos ingeridos, sendo que este número varia de acordo com a sorovariedade de *S. enterica* e o estado imunológico do paciente (DARWIN e MILLER, 1999). *S. enterica* Typhimurium apresenta um grande número de genes cuja atividade torna essa bactéria capaz de sobreviver em seus hospedeiros. Pesquisas têm identificado os potenciais genes necessários em uma ou mais etapas do processo infeccioso (MCCLELLAND *et al.*, 2001; DORMAN, 2009).

Fatores de virulência como sistemas de secreção do tipo III, antígeno Vi, lipopolissacarídeos e outros polissacarídeos de superfície, flagelos, e vários fatores essenciais para o ciclo de vida intracelular de *S. enterica* têm sido caracterizados. Genes que codificam tais fatores de virulência são comumente localizados em “ilhas de patogenicidade de *Salmonella*” (IPS). Plasmídeos também podem conter genes associados à virulência, bem como genes responsáveis por resistência a antimicrobianos (DE JONG *et al.*, 2012).

Nosso entendimento a respeito da biologia celular de *S. enterica* Typhimurium é bem avançado, entretanto, nossa compreensão sobre os mecanismos de regulação da maioria de genes de virulência ainda necessita de mais estudos (DORMAN, 2009). Por isso torna-se tão importante o estudo de proteínas reguladoras globais, tais como as NAPs (proteínas associadas ao nucleóide), e seus papéis sobre a expressão de outros genes, para que possamos conhecer melhor os mecanismos de patogenicidade de *S. enterica* (DORMAN, 2009).

O primeiro obstáculo a ser superado por *S. enterica* Typhimurium dentro do hospedeiro é o pH ácido do estômago. Para proteger-se contra o severo choque ácido, *S. Typhimurium* ativa a resposta de tolerância a ácido (*Acid Tolerance Response* - ATR), que é capaz de manter o pH intracelular em valores superiores aos do ambiente extracelular (FOSTER e HALL, 1991). No intestino delgado, *S. enterica* deve alcançar e atravessar a camada de muco do intestino antes de se aderir às células epiteliais intestinais. Em camundongos, *S. enterica* se adere preferencialmente às células M das placas de Peyer no epitélio intestinal, embora a invasão de enterócitos normalmente não fagocíticos também possa ocorrer (TAKEUCHI, 1967; JONES *et al.*, 1994). Logo após a adesão, o processo de invasão se dá por meio de vias de sinalização da célula hospedeira que levam à profunda reorganização do citoesqueleto (FINLAY *et al.*, 1991; FRANCIS *et al.*, 1992). Essas modificações internas induzem à formação de estruturas de

membrana que permitem com que a célula do intestino possa fagocitar as bactérias aderidas, em grandes vesículas denominadas vacúolos contendo *Salmonella* (*Salmonella-containing vacuoles* - SCVs), o único compartimento intracelular em que as células de *Salmonella* são capazes de sobreviver e replicar (FINLAY e FALKOW, 1988; FRANCIS *et al.*, 1993; GARCIA-DEL PORTILLO e FINLAY, 1994). Ao mesmo tempo, a indução de resposta secretora no epitélio intestinal inicia o recrutamento e a migração de fagócitos da camada submucosa do intestino para o lúmen intestinal. Este processo está relacionado com a produção de várias citocinas pró-inflamatórias (HOBBIE *et al.*, 1997; OHL e MILLER, 2001).

Ultrapassada a mucosa intestinal, *S. enterica* pode, desta maneira, alcançar diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro, causando infecção sistêmica (ALPUCHE-ARANDA *et al.*, 1994; MASTROENI e MASKELL, 2006; SCHROEDER *et al.*, 2011). IPS-2 (VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2000), IPS-3 (BLANC-POTARD *et al.*, 1999) e o sistema regulatório de dois componentes PhoP/Q (GROISMAN, 2001) são os principais responsáveis pela sobrevivência e multiplicação intracelular.

Medidas são necessárias para o controle de *S. enterica* e a classificação do gênero em sorovariedades facilita tais intervenções. Mudanças na prevalência de sorovares em populações humanas e animais podem ser resultantes da introdução de cepas através de viagens internacionais, migração humana, de alimentos, ração animal e comércio de carne (CLARK *et al.*, 1973; CRUMP *et al.*, 2002; AARESTRUP *et al.*, 2007; HENDRIKSEN *et al.*, 2008; ETHELBERG *et al.*, 2010). A falha no controle de *S. enterica* em um país apresenta um potencial problema para outros países. Assim, torna-se importante o monitoramento da distribuição de sorovares de *S. enterica* em cada país, a implementação de medidas de controle deste patógeno em toda a cadeia de produção de alimentos, bem como a análise da eficácia de

tais medidas (HENDRIKSEN *et al.*, 2011). O uso de vacina contra um determinado patógeno é também uma importante medida de controle do micro-organismo em questão, e no caso de *S. enterica* Typhimurium ainda há a necessidade de obter-se uma linhagem que possa ser eficientemente empregada como vacina em granjas, para aumento do controle da contaminação de aves de corte e conseqüentemente de seus consumidores, por essa bactéria.

1.3. *Salmonella enterica* e vacinas

A vacinação tem sido praticada há muitos anos e é um dos métodos mais eficazes para o controle de doenças infecciosas (BABIUK, 1999). O recente aumento na disponibilidade de sequências genômicas de uma ampla variedade de organismos patogênicos junto aos avanços na engenharia genética oferecem, atualmente, a oportunidade de desenvolver vacinas de forma eficiente, com alta proteção e imunogenicidade, contra uma variedade de doenças. Os agentes patogênicos contra os quais estas vacinas são desenvolvidas podem ser de origem viral, bacteriana, parasitária, ou fúngica, e as vacinas resultantes podem ser projetadas tanto para vacinação humana quanto animal (GALEN e CURTISS, 2013).

O desenvolvimento de vacinas para patógenos sem uma análise cuidadosa do balanço entre atenuação e resposta imune pode resultar em candidatos a vacinas que possuem excelentes características de proteção, mas que perderam a capacidade de ativar mecanismos efetores imunológicos e conseqüentemente falham em induzir a imunidade protetora. Estratégias recentes para produção de vacinas têm buscado este equilíbrio crítico entre proteção e imunogenicidade (GALEN e CURTISS, 2013).

Com relação às vacinas contra *S. enterica*, observa-se a atenuação de cepas selvagens em casos onde há a deleção de fatores de virulência, como também com a inibição de vias

metabólicas. A maioria das construções vacinais foi realizada para os sorovares Typhimurium e Typhi (GALEN e CURTISS, 2013). Apesar da importância da doença causada por *S. enterica* Typhi, especialmente na África, doenças causadas pelos sorovares Paratyphi A e sorovares não-tifóides invasivos (*invasive Non-Typhoidal Salmonella* - iNTS) continuam a ser um grande problema nos países em desenvolvimento e para pessoas que viajam para esses países (MARTIN, 2012).

A maioria das vacinas contra *S. enterica* foram geradas por deleção de genes essenciais em vias metabólicas, ilhas de patogenicidade ou reguladores globais, mas não há atualmente nenhuma vacina para salmonelas não-tifóides (*Non-Typhoidal Salmonella* - NTS). Contra *S. enterica* Typhi existem atualmente, duas vacinas licenciadas, a vacina de polissacarídeo Vi e uma vacina viva atenuada. Alguns estudos têm mostrado que a resposta de anticorpos específicos contra *S. enterica* em crianças africanas pode estar associada com resistência às doenças provocadas por sorovares não-tifóides invasivos e que tais anticorpos conferem proteção em modelo murino de infecção. Assim, fica evidente a necessidade de desenvolver novas vacinas contra *S. enterica* que podem proteger contra doenças provocadas por NTS (KHAN *et al.*, 2003; MACLENNAN *et al.*, 2010; ALLAM *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013).

1.4. Proteínas associadas ao nucleóide bacteriano

Na célula bacteriana, o cromossomo encontra-se altamente condensado e fica em uma espécie de pseudo-compartimento que frequentemente ocupa uma região distinta no interior da célula (ROBINOW e KELLENBERGER, 1994). Esta área densa da célula é equivalente funcional do núcleo eucariótico e é, por conseguinte, denominado nucleóide (THANBICHLER *et al.*, 2005).

Uma série de mecanismos incluindo a ligação de proteínas e o enovelamento do DNA permitem que o cromossomo bacteriano seja compactado, adequando-se ao tamanho limitado da célula bacteriana. O DNA cromossômico é ainda mais condensado por meio de pequenas proteínas associadas ao nucleóide (NAPs – *Nucleoid-Associated Proteins*) que influenciam a topologia do DNA (LUIJSTERBURG *et al.*, 2006). Essas proteínas alteram a topologia do DNA curvando-o (*bending*), unindo pontos da mesma molécula (*bridging*) ou enrolando-o (*wrapping*). Devido à sua capacidade de ligação ao DNA, as NAPs também podem desempenhar um papel importante na regulação gênica global (DILLON e DORMAN, 2010).

Proteínas que alteram a topologia do DNA para torná-lo mais compacto e que têm o potencial de influenciar a transcrição são encontradas nos três reinos da vida. Em eucariotos, essas proteínas são conhecidas como histonas e o seu papel sobre a estrutura da cromatina e transcrição é bastante estudado, o que levou pesquisadores a classificarem proteínas que realizam tarefas análogas em bactérias como “proteínas do tipo histonas” (*histone-like proteins*). No entanto, esta terminologia foi tornando-se cada vez menos adequada assim que a natureza distinta destas proteínas bacterianas foi sendo descrita. Tais proteínas são agora denominadas como proteínas associadas ao nucleóide (*Nucleoid-Associated Proteins* - NAPs), o que reflete com mais precisão a sua localização celular, sem implicar que elas apresentem semelhança estrutural com histonas (DRLICA e ROUVIERE-YANIV, 1987; DORMAN e DEIGHAN, 2003; DILLON e DORMAN, 2010).

As NAPs constituem um grupo heterogêneo de polipeptídeos (ALI AZAM *et al.*, 1999; AZAM e ISHIHAMA, 1999) e são agrupadas de modo a formarem uma família de proteínas, com base nas suas similaridades. Elas ligam-se a ácidos nucleicos (DNA geralmente) e têm

massas moleculares baixas (DORMAN, 2004). As NAPs são numerosas e diversificadas (DILLON e DORMAN, 2010) e as mais estudadas em gram-negativas são HU, Fis, IHF e H-NS.

Bactérias gram-negativas apresentam 12 tipos diferentes de NAPs descritas (Tabela 1) e cada um desses tipos tem o seu padrão de expressão característico e regiões preferenciais de ligação ao DNA (DORMAN, 2004; DILLON e DORMAN, 2010). O estudo de algumas dessas NAPs em *E. coli* mostrou que essas proteínas geralmente são altamente expressas, e diferem uma da outra quanto à fase de crescimento na qual são expressas e o grau de especificidade à sequência de DNA (ALI AZAM *et al.*, 1999; AZAM e ISHIHAMA, 1999). Os efeitos das NAPs sobre a fisiologia bacteriana levou a vários estudos a nível do genoma sobre a ligação de tais proteínas no DNA e seus efeitos sobre a transcrição em *E. coli* e *S. enterica*, os quais muitas vezes chegaram em conclusões diferentes sobre as funções de certas NAPs, ressaltando a complexidade da compreensão do papel de tais proteínas (DILLON e DORMAN, 2010).

Tabela 1. Proteínas associadas ao nucleóide (NAPs) de bactérias gram-negativas. Adaptada de Dillon e Dorman (2010).

Proteína ou grupo de proteínas	Massa molecular	Protômero nativo
HU	~ 9KDa	Heterodímero (HU α -HU β)
Lrp	~ 18 KDa	Homodímero
MukB	~ 175 KDa	Homodímero
Fis	~ 11 KDa	Homodímero
H-NS	~ 15 KDa	Homodímero ou Heterodímero (H-NS - StpA)
IHF	~ 11 KDa	Heterodímero (IHF α -IHF β)
Dps	~ 19 KDa	Monômero ou dodecâmero
StpA	~ 15 KDa	Homodímero ou Heterodímero (StpA - H-NS)
CbpA	~ 33 KDa	Homodímero ou Heterodímero (CbpA-CbpM)
CbpB	~ 33 KDa	Monômero
EbfC	~ 11 KDa	Homodímero
MvaT	-	Homodímero

Além de ter influência sobre a arquitetura do DNA, as NAPs também desempenham um importante papel na regulação transcricional de genes que respondem a mudanças ambientais (MCLEOD e JOHNSON, 2001). A composição protéica do nucleóide bacteriano não é algo estático e reflete as necessidades celulares, de acordo com as condições ambientais ou fase de crescimento (AZAM e ISHIHAMA, 1999).

StpA foi inicialmente identificada por complementar algumas funções de H-NS em células deficientes para a expressão desta última (LUCCHINI *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2012). Em *S. enterica* Typhimurium, StpA é uma proteína codificada por um gene parálogo a H-NS, descrita como sendo repressora do *regulon* RpoS durante a fase exponencial de crescimento (LUCCHINI *et al.*, 2009). Desta forma, StpA tem papel fisiológico importante com relação ao fator sigma S (RpoS).

As proteínas StpA (15,5KDa) e H-NS são os principais componentes do nucleóide de *E. coli* e *S. enterica* Typhimurium (LUIJSTERBURG *et al.*, 2006) e são proteínas relacionadas, com 52% de identidade. A proteína H-NS pode se polimerizar ao longo do DNA formando um filamento núcleo-protéico ou intermediar conexões entre regiões do DNA, podendo desempenhar um importante papel no silenciamento de genes. Ao contrário do observado para H-NS, o mecanismo de interação de StpA com o DNA não é bem compreendido (LIM *et al.*, 2012).

H-NS e StpA apresentam a propriedade de se ligarem tanto em DNA quanto em RNA e StpA pode agir como uma chaperona de RNA na regulação de genes bacterianos e de bacteriófagos (ZHANG *et al.*, 1996; SONNENFIELD *et al.*, 2001; DORMAN, 2004). H-NS e StpA podem formar oligômeros, pois apresentam aminoácidos conservados localizados principalmente nos seus domínios de ligação ao DNA, o que permite que essas proteínas possam interagir, formando heterômeros (DORMAN, 2004; WILLIAMS *et al.*, 1996; JOHANSSON e

UHLIN, 1999; LEONARD *et al.*, 2009). Não existem dados na literatura sobre o fenótipo de atenuação da virulência de mutantes $\Delta stpA$ em *S. enterica*.

EbfC é uma NAP que foi descrita inicialmente em *Borrelia burgdorferie* e posteriormente em *E. coli* e *Haemophilus influenzae* (COOLEY *et al.*, 2009; RILEY *et al.*, 2009). Foi descrito que esta proteína liga-se como um homodímero a uma sequência específica no DNA. Genes homólogos a *ebfC* são amplamente distribuídos entre bactérias Gram-negativas, o que indica que esta NAP desempenhe papel biológico importante. O homólogo em *S. enterica* e *E. coli* é denominado *ybaB*. Na literatura não existem mutantes descritos para *ybaB* em *S. enterica* Typhimurium.

Quase todas as espécies de eubactérias apresentam genes homólogos a *ebfC*, também conhecidos como Orf-12, Orf-107 ou *ybaB* (JUTRAS *et al.*, 2012). Cooley e colaboradores (2009) e Riley e colaboradores (2009) foram os primeiros autores a identificarem proteínas da família EbfC/YbaB como NAPs. Homodímeros de EbfC formam uma estrutura que tem sido descrita como “par de pinças” (LIM *et al.*, 2003; RILEY *et al.*, 2009) provocando curvaturas no DNA (JUTRAS *et al.*, 2012). A conservação de genes *ebfC* no domínio Eubacteria sugere que os ortólogos em outras espécies apresentem a mesma função que *ebfC* e podem participar, de maneira similar, da regulação gênica global (JUTRAS *et al.*, 2012). Neste trabalho, para construção de mutantes $\Delta stpA$ e $\Delta ybaB$, o sistema de recombinação homóloga descrito por Datsenko e Wanner (2000) foi utilizado. Desta forma, segue uma breve descrição sobre este sistema.

1.5. Sistema λ Red e deleção gênica

A recombinação homóloga permite o pareamento e troca de fitas de DNA entre trechos homólogos de DNA (MATSUBARA *et al.*, 2013). O sistema de recombinação λ Red foi utilizado inicialmente em *E. coli* (MURPHY, 1998; ZHANG *et al.*, 1998; COURT *et al.*, 2002; SHARAN *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2012) para a obtenção de linhagens recombinantes. As recombinases que catalisam a recombinação entre moléculas de DNA homólogas são codificadas pelo *operon red* do bacteriófago λ , onde o gene *exo* (*red* α) codifica uma exonuclease 5'→3', capaz de criar uma extremidade de fita simples no fragmento de DNA linear introduzido na célula bacteriana; o gene *bet* (*red* β) codifica uma proteína que se liga ao DNA de fita simples, promovendo o pareamento de duas moléculas de DNA complementares, e o gene *gam* (*red* γ) codifica a proteína Gam, a qual protege fitas lineares de DNA de serem degradadas por endonucleases do hospedeiro, tais como RecBCD e SbcCD. Todos estes genes foram clonados em vetores plasmidiais para permitir a utilização desse sistema de recombinação em bactérias Gram-negativas. Um desses vetores é o plasmídeo pKD46 (Figura 1) (MURPHY, 1991; DATSENKO e WANNER, 2000; SONG *et al.*, 2010).

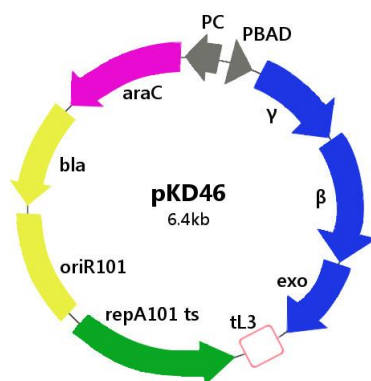


Figura 1. Representação esquemática do plasmídeo pKD46, utilizado no presente trabalho. Este plasmídeo contém os genes codificadores do sistema de recombinação λ Red. Notar a presença do *operon red* do fago λ (γ , β e *exo*). Adaptada de DATSENKO e WANNER (2000).

O fragmento de DNA necessário para permitir a recombinação homóloga via sistema λ *Red* é caracteristicamente formado por 35 a 50 pares de bases (pbs) (POTEETE, 2001; COURT *et al.*, 2002). A bactéria a ser modificada geneticamente é inicialmente transformada ou eletroporada com o plasmídeo pKD46. Posteriormente, o “cassete de recombinação” é montado de tal forma a conter um gene de resistência a antibióticos flanqueada por sequências homólogas ao gene bacteriano a ser deletado. Este cassete, obtido por PCR e consequentemente linear, é eletrotransformado em células contendo o plasmídeo pKD46 crescidas na presença de arabinose, indutora do *operon red*. A expressão das recombinases e da inibidora de exonucleases permite então a troca alélica do gene alvo pelo gene de resistência ao antibiótico (DATSENKO e WANNER, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

Salmonella enterica é um dos patógenos de origem alimentar mais prevalente, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos e idosos. Anualmente, milhões de casos de febre tifóide e infecções causadas por sorovares não Typhi ou Paratyphi (NTS) são diagnosticados e grande número de mortes é observado a nível mundial. Assim, fica evidente a importância desse patógeno em termos de saúde pública.

Desta forma, o entendimento de diferentes aspectos da biologia dessa bactéria é de extrema importância em estudos que visam o seu controle. Mutantes atenuados, por exemplo, são potenciais candidatos a serem utilizados como linhagens vacinais. De fato, existem duas vacinas licenciadas contra *S. enterica* Typhi, mas não há nenhuma vacina para salmonelas NTS. Doenças causadas por sorovares NTS continuam a ser um grande problema nos países em desenvolvimento e consequentemente para pessoas que viajam para esses países ou têm contato com pessoas oriundas desses locais.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de linhagens mutantes de *S. enterica* para genes codificadores de NAPs, uma vez que estudos relacionados a essas proteínas têm demonstrado o papel importante que elas apresentam na virulência bacteriana. Nossos dados sugerem que na maioria dos casos, tais proteínas têm papel importante na patogenicidade. No presente trabalho, buscamos complementar tais estudos com a caracterização de mutantes nulos de *S. enterica* para as NAPs StpA e YbaB quanto a patogenicidade no modelo murino e outras características fenotípicas.

No caso de *stpA*, nosso objetivo principal foi responder se mutantes nulos para este gene são atenuados quanto à virulência. No caso de *ybaB*, não existem dados na literatura sobre o

papel desta NAP em enterobactérias e assim, procuramos responder a esta questão, gerando dados inéditos sobre a função da proteína YbaB na biologia de *S. enterica*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Construir mutantes nulos para os genes *stpA* e *ybaB* de *S. enterica* Typhimurium e avaliar o fenótipo dessas linhagens mutantes.

3.2. Específicos

- Construir mutantes nulos de *S. enterica* Typhimurium para os genes *stpA* e *ybaB* utilizando o sistema de recombinação λ Red;
- Avaliar a(s) possível(eis) função(ões) biológica(s) do gene *ybaB* em *S. enterica* através da análise fenotípica do mutante ($\Delta ybaB$) quanto ao crescimento *in vitro*, resistência ao estresse nutricional (sobrevivência em fase estacionária), sobrevivência a estresse de pH e atenuação da virulência no modelo murino de infecção;
- Avaliar o fenótipo de virulência do mutante $\Delta stpA$ no modelo murino de infecção;
- Caso o nível de atenuação fosse satisfatório, ou seja, 3 ordens de grandeza ou mais de variação da DL_{50} , estes mutantes seriam avaliados quanto a propriedade de conferir proteção no modelo murino de infecção, visando aplicação biotecnológica no desenvolvimento de vacinas baseadas em *S. enterica*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens Bacterianas

As duas linhagens bacterianas utilizadas no presente trabalho pertencem à coleção do laboratório (Laboratório de Genética e Biologia Molecular Bacteriana - IB / UNICAMP) e foram isoladas de pacientes humanos com quadro de enterite, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. Essas cepas foram anteriormente caracterizadas quanto aos fatores de patogenicidade de *S. enterica* e avaliadas quanto à sensibilidade antimicrobiana.

Tais linhagens pertencem a dois sorovares. Uma *Salmonella enterica* Typhimurium denominada 662STm, e a outra é uma cepa monofásica flagelar (expressa apenas um tipo de flagelina), derivada de Typhimurium, *S. enterica* I 4,[5],12:i:-, denominada 607STi. *S. enterica* é capaz de expressar dois tipos diferentes de flagelinas (fase 1 e fase 2), coordenando mecanismos de expressão para que uma flagelina seja expressa de cada vez. Tal mecanismo é chamado de variação de fase flagelar (YAMAMOTO e KUTSUKAKE, 2006). Essas cepas já são utilizadas na construção de mutantes em nosso laboratório. O uso de tais linhagens foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

4.2. Meios de cultura e armazenamento das linhagens bacterianas

Os principais meios de cultura utilizados foram o meio LB (Luria Bertani) líquido, LB-Ágar e Meio Mínimo M9 (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Placas com meio *Mint-Green* também foram utilizadas para seleção de *S. enterica* livre de bacteriófago P22HT, após o processo de transdução (MALOY *et al.*, 1996). Quando foi necessário acrescentar os antibióticos ampicilina e cloranfenicol no meio de cultura, estes foram utilizados nas concentrações descritas em Sambrook e Russell (2001). Ao longo de todo o desenvolvimento do projeto, para confirmar

que as culturas bacterianas estavam puras, foram utilizados os meios de cultura LB-Ágar, MacConkey e SS (Oxoid do Brasil Ltda, São Paulo, SP). As linhagens bacterianas foram estocadas a -80°C em LB líquido com glicerol 30% (v:v).

Antes que qualquer procedimento fosse realizado com as linhagens bacterianas em estoque, ou seja, que estavam sob -80°C, foi realizado um inóculo para cultivo bacteriano, o qual consistiu em pegar, com o auxílio de uma alça de inoculação de 10 µL, células da cultura estoque e inocular em um tubo de polipropileno de 15 mL contendo 3 mL de LB líquido. Este inóculo foi então incubado a 37° C, sob agitação de 150 rpm, por 18 horas.

4.3. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste estudo foram: pKD46, pKD3 e pCP20. Estes plasmídeos compõem o sistema de recombinação λ *Red* (DATSENKO e WANNER, 2000) e foram utilizados na construção dos mutantes avaliados no presente estudo. Os plasmídeos são provenientes de cepas de *E. coli*, classificadas de acordo com o CGSC (*Coli Genetic Stock Center*, New Haven, USA) como BW25113 CGSC#7739 (contém pKD46), BW25141 CGSC#7631 (pKD3) e BT340 CGSC#7629 (pCP20). Tais plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Barry L. Wanner (*Department of Biological Sciences, Purdue University, West Lafayette, USA*).

Preparações purificadas de DNA plasmidial foram realizadas utilizando-se o kit *Illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare Life Sciences, USA). O protocolo do kit foi seguido, mas pequenas alterações foram realizadas visando a melhora da extração. Inicialmente, foi feito um

inóculo da linhagem bacteriana a partir da cultura estoque. No dia seguinte, a cultura bacteriana foi sedimentada por centrifugação de 16000 x g por 30 segundos, a 4°C (Eppendorf *Centrifuge* 5804R, Rotor F-34-6-38). Em seguida, tampões para lise celular e extração do DNA foram adicionados à preparação (tampão contendo RNase, tampão para tratamento alcalino e por último tampão para neutralização do pH da preparação), de forma sequencial e obedecendo os tempos indicados no protocolo do kit. A coluna de afinidade presente no kit foi utilizada para ligação do DNA plasmidial, e então, após centrifugação de 16000 x g por 30 segundos, a 4°C (Eppendorf *Centrifuge* 5804R, Rotor F-34-6-38), o tampão de lavagem foi adicionado. Finalmente, o DNA plasmidial ligado na coluna foi eluído em 30 µL de água deionizada.

4.4. Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c/AnUnib, as quais foram adquiridas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP, para avaliação do fenótipo de virulência dos mutantes construídos. Os camundongos foram acondicionados em mini-isoladores de policarbonato, os quais foram colocados em *racks* ventilados (Alesco, Brasil), em condições livres de patógenos, no Laboratório de Experimentação Animal, composto por uma sala com ciclo claro/escuro de 12 horas. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvilab - Nuvital Nutrientes, Quimtia) e água a vontade, ambas esterilizadas por meio de autoclavagem a 121°C por 30 minutos. Os experimentos foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNICAMP e devidamente aprovados, com protocolos nº 2899-1 e 3125-1 (Anexo 1).

4.5. Construção de mutantes de *S. enterica*

Foram construídos mutantes de *S. enterica* Typhimurium $\Delta stpA$ e *S. enterica* Typhimurium $\Delta ybaB$ das linhagens 662STm e 607STi. Os mutantes foram construídos por deleção de genes utilizando o sistema λ Red (Figura 2) (DATSENKO e WANNER, 2000). O protocolo utilizado é o previamente descrito pelos autores.

4.5.1. Preparo de células eletrocompetentes

O volume de 500 μ L de um pré-inóculo da linhagem bacteriana de *S. enterica* crescido por aproximadamente 18 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm foi inoculado em erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB líquido (diluição 1:100). A cultura foi então incubada a 37°C, sob agitação de 150 rpm, por aproximadamente 3 horas, até atingir uma densidade ótica (DO₆₀₀) de 0,6 A (absorbância). Em seguida, a cultura foi mantida em gelo por 30 minutos. A suspensão de células foi então transferida para um tubo de polipropileno de 50 mL esterilizado e as células sedimentadas por centrifugação a 1600 x g, por 15 minutos, a 4°C (Eppendorf *Centrifuge* 5804R, Rotor F-34-6-38). O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensionado em 50 mL de água deionizada gelada (4°C). Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições acima descritas. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuspensionado em 25 mL de solução gelada (4°C) de glicerol a 10% em água deionizada. As células foram então sedimentadas, o sobrenadante descartado e ressuspensas em 10 mL de solução gelada (4°C) de glicerol a 10% em água deionizada. Centrifugou-se mais uma vez, houve descarte do sobrenadante e o sedimento de células foi finalmente ressuspensionado em 200 μ L de solução gelada de glicerol a 10% em água deionizada. Este volume final de suspensão de células foi então distribuído em alíquotas de 40 μ L de células e estas foram armazenadas a -80°C.

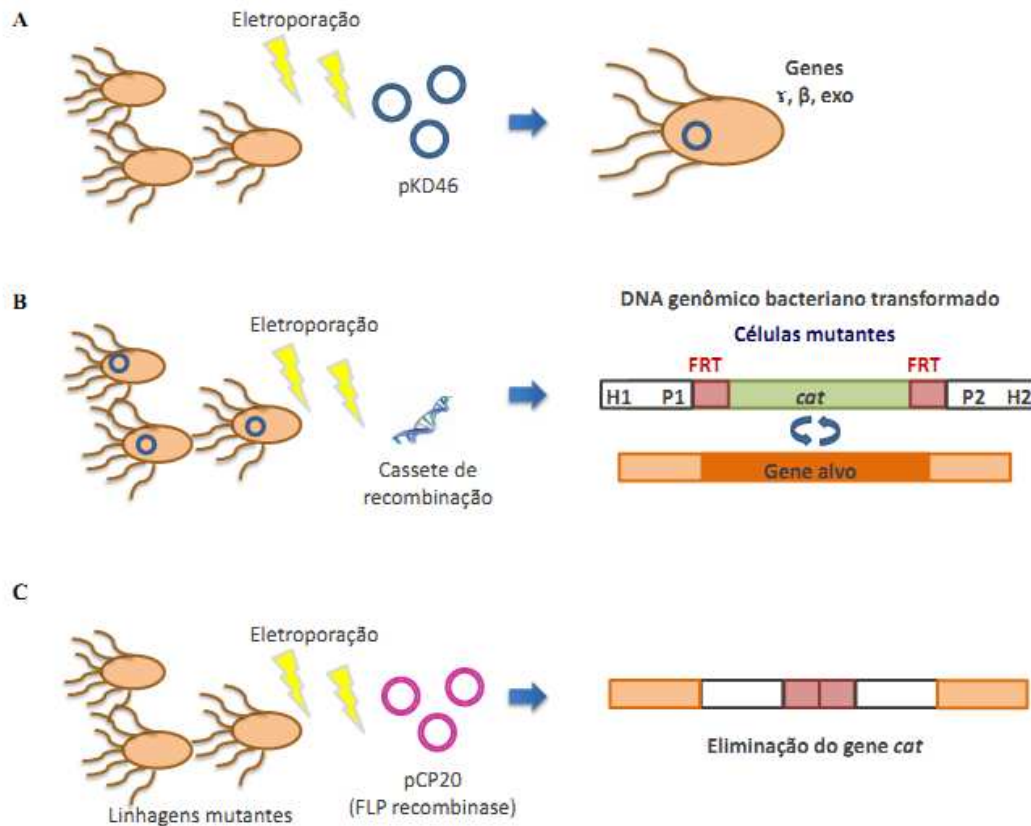


Figura 2. Representação esquemática da estratégia utilizada no presente trabalho para construção dos mutantes *AstpA* e *AybaB*, a partir do sistema de recombinação homóloga (λ Red) descrito por Datsenko e Wanner (2000). **A.** Transformação das células selvagens eletrocompetentes com o plasmídeo pKD46, que contém o *operon red* do fago λ (α , β e exo), o qual permite que o processo de recombinação entre um fragmento linear de DNA (cassete de recombinação) e o DNA genômico (gene alvo a ser deletado) ocorra. **B.** Transformação das células com o cassete de recombinação obtido a partir do plasmídeo pKD3, que apresenta o gene *cat*, responsável por codificar a enzima Cloranfenicol Acetil Transferase (Cat), conferindo a tais células resistência ao antibiótico cloranfenicol. Além do gene *cat*, o cassete de recombinação apresenta regiões FRT, importantes para excisão do gene *cat* posteriormente; regiões P1 e P2 (*primer sites*) necessárias para a hibridação dos iniciadores ao plasmídeo pKD3 durante reação de PCR para construção do cassete e regiões H1 e H2, homólogas as sequências adjacentes ao gene a ser deletado e que portanto permitem a recombinação do cassete de recombinação com o DNA genômico da bactéria. **C.** Eliminação do gene que confere resistência ao cloranfenicol (*cat*), por meio da transformação das células mutantes com o plasmídeo pCP20, o qual expressa FLP recombinase, capaz de promover a recombinação entre regiões FRT, eliminando o gene *cat*.

4.5.2. Transformação de células eletrocompetentes com o plasmídeo pKD46

Uma alíquota de células eletrocompetentes de *S. enterica* foi descongelada em gelo por cerca de 30 minutos. Ao tubo contendo as células foi então adicionado 1 µL da preparação plasmidial de pKD46 (50 ng/µL). O tubo foi mantido em gelo por cerca de 20 minutos. Todo o conteúdo foi colocado em uma cubeta para eletroporação (*Gene Pulser Cuvette*, 0,1 cm *electrode* - BioRad, USA) e levado para o eletroporador (*Gene Pulser XCell Electroporation System* - BioRad, USA). Logo após o pulso (1,8 kV, 25 µF e 200 W), foi adicionado na cubeta 1 mL de LB líquido mantido a 30°C. Todo o material foi homogeneizado e posteriormente pipetado em microtubo. A suspensão de células foi então incubada a 30°C por duas horas e em seguida foi distribuída em placas de LB com ampicilina (200 µg/mL), uma vez que o plasmídeo confere à linhagem selvagem resistência a este antibiótico. A nova cultura foi incubada a 30°C por 16-18 horas aproximadamente.

4.5.3. Obtenção do cassete de recombinação por PCR

Para mutagênese dos genes *stpA* e *ybaB* pelo sistema λ *Red*, para cada mutante simples a ser construído, foi necessário obter por meio de uma reação de PCR, um cassete de recombinação contendo um gene marcador, flanqueado pelas regiões FRT (*FLP Recognition Target*). A presença dessas sequências é importante uma vez que possibilita a eliminação do gene de resistência por recombinação, mediada pela introdução na célula recombinante de um plasmídeo contendo o gene que expressa a recombinase FLP. Em nosso trabalho, o gene marcador foi o que codifica a enzima Cloranfenicol Acetil Transferase (Cat), com regiões FRT em suas extremidades. Tal cassete de recombinação foi obtido a partir de reação de PCR tendo como molde sequência do plasmídeo pKD3. Para obtenção de tal produto de PCR, foram utilizados

oligonucleotídeos iniciadores complementares às sequências flanqueadoras dos genes *stpA* e *ybaB*. Os iniciadores foram desenhados de forma a deletar a sequência inteira do gene alvo (Tabela 2). A temperatura de hibridação de tais iniciadores foi de 68°C.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *cat* (Cloranfenicol Acetil Transferase). Os nucleotídeos destacados em negrito se hibridam ao plasmídeo pKD3, próximo à região que contém o gene *cat*. O restante da sequência é homólogo as sequências adjacentes aos genes a serem deletados.

Iniciadores para amplificação do gene marcador		
Identificação	Número de Bases Nucleotídicas	Sequência de nucleotídeos
stpAP1	70	5'- GGTTAATAGAGACAGGAAACGAAGCGCCATCTGTAA AAGCTATCCGTGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC -3'
stpAP2	70	5'- TACCGCCTGTAATAGTTTTTTGTTTTCTGCGTAAAAG GTTTTTATTGATATGGGAATTAGCCATGGTCC -3'
ybaBP1	71	5'- ATTTGATCGTAAGCCCGGCTTGCGATTGTGAACCATC AAGAGAGAGAGCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC -3'
ybaBP2	70	5'- TGAGTTAACAGCGGACTGGTTTGCATCAGAATGGCAT CTTAAAGCCTGGCATGGGAATTAGCCATGGTCC -3'

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o kit *One Taq DNA Polymerase* (New England BioLabs, USA). Uma reação de 50 µL foi preparada para cada amostra, colocada em um microtubo de polipropileno com volume de 200 µL contendo uma mistura de tampão 1X (5X *One Taq Standard Reaction Buffer*), 200 µM de solução de dNTPs (10 mM dNTPs), 0,2 µM de cada *primer* a 10 pmol/µL, 0,25 µL (1,25 unidades / 50 µL PCR) de *Taq* Polimerase (5000 U / mL) e 35,75 µL de água deionizada. Após preparo da mistura, foram colocados cerca de 50 ng da preparação plasmidial de pKD3.

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose. Foram aplicados 2 μ L de corante (*Safer Dye Avati* - Biometrix, Brasil) e 5 μ L da reação de PCR em gel de agarose ultra-pura 1% (Invitrogen) em tampão TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Como marcador, foram aplicados 0,2 μ g do padrão de peso molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas, Thermo Scientific). O resultado foi visualizado e fotografado em aparelho de fotodocumentação (*Gel Logic*, Carestream, USA) sob luz ultravioleta.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences, USA). O protocolo utilizado foi o de purificação de DNA a partir de gel de agarose, conforme instruções do fabricante.

4.5.4. Transformação de células eletrocompetentes com produtos de PCR

Após a realização das reações de PCR, foi dada continuidade no processo de construção dos mutantes. Para isso, células de *S. enterica* contendo o plasmídeo pKD46 foram novamente preparadas para eletroporação. O preparo de células eletrocompetentes foi semelhante ao realizado anteriormente, com a diferença de que ampicilina (50 μ g/ μ L) e arabinose (2 mM/mL) foram adicionadas à cultura, que foi incubada a 30°C, uma vez que pKD46 tem origem de replicação termosensível. A arabinose é um açúcar capaz de induzir a expressão dos genes do *operon red*, importantes no processo de recombinação homóloga. Isso ocorre porque esses genes estão sob o controle do promotor de *araC*.

Logo após o preparo de células eletrocompetentes, duas alíquotas dessas células foram separadas e cada uma recebeu um diferente produto de PCR, um resultante de reação com iniciadores com nucleotídeos homólogos à região flanqueadora do gene *stpA* (stpAP1/stpAP2) e

outro com iniciadores homólogos à região flanqueadora de *ybaB*(ybaBP1/ybaBP2). Após a eletroporação, os mutantes foram selecionados em placas com meio LB-Ágar contendo cloranfenicol (25 µg/µL).

4.5.5. Confirmação da deleção gênica

Após transformação das células com os produtos de PCR, a seleção de mutantes de *S. enterica* foi feita em meios de cultura contendo cloranfenicol (25 µg/mL), conforme descrito anteriormente. Posteriormente, foi realizada nova reação de PCR utilizando iniciadores externos (Tabela 3) ao cassete de recombinação para confirmar a mutação dos genes alvo. Tais reações de PCR foram realizadas nas mesmas condições anteriormente descritas, sendo que o DNA molde foi proveniente da bactéria recombinante selecionada em meio com cloranfenicol. Com auxílio de uma ponteira, parte da massa celular de uma colônia bacteriana candidata a mutante foi introduzida em microtubo de polipropileno contendo a mistura de reagentes para PCR.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção da deleção dos genes *stpA* e *ybaB* em *Salmonella enterica*.

Iniciadores para detecção da deleção gênica		
Identificação	Número de Bases Nucleotídicas	Sequência de nucleotídeos
stpADT-F	20	5'- AAAAATGCCCTGGAATACCC -3'
stpADT-R	20	5'- CCAAACGGGAAACCTACAGA -3'
ybaBDT-F	20	5'- AGCTGGCGGCTAAACTGGCG - 3'
ybaBDT-R	20	5'- TAAAGGTGCGGCAGTCGGCG - 3'

Os iniciadores ybaBDT-F e ybaBDT-R se hibridam ao DNA alvo na temperatura de 63°C, enquanto que os iniciadores de detecção stpADT-F e stpADT-R necessitam de temperatura de hibridação mais baixa, 56°C.

Em seguida, iniciou-se o processo para cura do plasmídeo pKD46, que consistiu em crescer as linhagens mutantes a 37°C, uma vez que a proteína que atua sobre a origem de replicação do plasmídeo é termossensível. Após essa etapa, para confirmar que o plasmídeo foi perdido, células mutantes isoladas foram semeadas em placa de LB sem antibiótico e placa de LB contendo ampicilina (200 µg/mL). As colônias que apresentaram crescimento apenas na placa de LB sem antibiótico foram selecionadas para dar prosseguimento ao processo de construção de mutantes. A perda do plasmídeo pKD46 foi confirmada transferindo-se algumas colônias para placas com e sem ampicilina, e apenas os clones sensíveis a este antibiótico foram selecionados para os procedimentos seguintes.

4.5.6. Transdução

Para garantir que não selecionamos células com LPS (lipopolissacarídeos) incompletos, já que estas são mais facilmente eletroporadas e nem células com outras recombinações que porventura podem ter resultado da ação das recombinases codificadas por genes de pKD46, tais mutantes foram submetidos a transdução. Esse procedimento foi realizado utilizando-se o bacteriófago P22HT, em um processo no qual a região de DNA contendo a mutação de interesse é transduzida da linhagem mutada (“doadora”) para a linhagem selvagem, (“receptora”), que por sua vez, torna-se mutante. Para isso, inicialmente foi feita a propagação de bacteriófagos P22HT a partir de uma suspensão estoque do bacteriófago, na qual um título de 5×10^{10} UFP (unidade formadora de placa de lise) / mL foi obtido.

A propagação de bacteriófagos P22HT consistiu em inicialmente preparar um inóculo da bactéria selvagem, de acordo com as condições anteriormente descritas (Item 4.2). Com uma alça de inoculação, a cultura foi inoculada em 7,5 mL de LB líquido, e essa cultura foi então incubada por 3 horas a 37°C, sob agitação de 150 rpm. Em seguida, foram adicionadas à cultura 100 µL de solução de glicose 1 M, 50 µL de E Salts, cujo preparo pode ser visualizado no Anexo 2, e 100 µL da suspensão de fagos em estoque. A cultura foi então incubada por 2 dias a 37°C, sem agitação. Após incubação, foram adicionados 100 µL de clorofórmio e o tubo contendo a cultura foi então deixado sob agitação de 150 rpm por 15 minutos. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 12000 x g por 5 minutos (Eppendorf *Centrifuge* 5804R, Rotor F-34-6-38) e o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,22 µm (*Syringe Driven Filter Unit*, Millex-HV, Millipore Corporation, USA). Ao final, foram adicionados 100 µL de clorofórmio à solução de fagos obtida.

Após a propagação de bacteriófagos, foi realizada a titulação da suspensão obtida. Para isso, no dia anterior, foi feito o inóculo da mesma linhagem bacteriana utilizada para propagação dos bacteriófagos. Em seguida, foram inoculados 500 µL da cultura obtida, em tubo de polipropileno com volume de 50 mL contendo 3 mL de meio LB semi-sólido, o qual consiste em meio LB contendo 0,7% de ágar. É importante que o meio semi-sólido seja mantido em banho-maria a 50°C até o momento da inoculação das bactérias. Após o inóculo, o conteúdo do tubo foi homogeneizado em agitador (Daigger Vortex Genie 2, *Scientific Industries*, USA) e rapidamente vertido sobre uma placa de LB. Após solidificação do meio, foram pipetados 5 µL de diferentes diluições (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-10}) da suspensão de fagos a ser titulada, sobre o meio semi-sólido com a bactéria indicadora. A cultura foi então incubada a 37° e no dia seguinte contou-se as UFPs.

Para realização da transdução, foram adicionados 500 µL do inóculo da célula doadora em um tubo de polipropileno de 50 mL. Em seguida, foram adicionados ao tubo 2 mL da suspensão de fagos e este foi incubado sob agitação de 150 rpm, a 37°C, por 16-18 horas. Nesse mesmo dia, foi realizado um inóculo da célula bacteriana receptora. No dia seguinte, 1,5 mL da mistura de fagos com células doadoras foram transferidos para um microtubo de 2 mL. Em seguida, 50 µL de clorofórmio foram adicionados e a mistura, após homogeneizada por agitação (Daigger Vortex Genie 2, *Scientific Industries*, USA) foi precipitada por centrifugação a 22000 x g por 4 minutos (Eppendorf *Centrifuge* 5804R, Rotor F-34-6-38). Em seguida, o sobrenadante foi passado em filtro (*Syringe Driven Filter Unit*, Millex-HV, Millipore Corporation, USA) de 0,45 µm. Posteriormente, em um novo microtubo de 2 mL, foram colocados 100 µL da célula receptora e 100 µL da suspensão de fagos filtrada, que foram incubados a 37°C, por 15 minutos. Adicionou-se então 900 µL de LB líquido, e as células foram novamente incubadas a 37°C, por 15 minutos. Finalmente, foram distribuídos 200 µL da mistura em placas de LB contendo cloranfenicol (25 µg/mL). As colônias que cresceram nessas placas foram selecionadas, pois apresentaram resistência ao cloranfenicol e consequentemente, a deleção do gene de interesse.

Como controle, a suspensão de fagos foi semeada em meio com cloranfenicol para confirmar que esta se encontrava livre de células bacterianas doadoras. Também, uma nova PCR com iniciadores externos ao cassete de recombinação (iniciadores de detecção) foi realizada para confirmação da mutação dos genes alvo.

Após transdução, os mutantes foram inoculados em placas de meio *Mint Green* para avaliar se as células bacterianas mutantes estavam livres de bacteriófagos P22HT. O preparo desse meio de cultura está anexado no final do texto (Anexo 2).

Com auxílio de uma alça de inoculação, a suspensão de bacteriófagos P22HT foi depositada na placa de *Mint Green*, sobre uma reta traçada no centro da placa. A partir daí, com um palito esterilizado, as colônias bacterianas a serem avaliadas foram inoculadas no meio de cultura em uma das extremidades da placa e levadas até a outra extremidade, de modo a terem contato com a suspensão de bacteriófagos do centro da placa. O meio *Mint Green* contém dois corantes indicadores de pH. Dessa forma, as células que estiverem livres de bacteriófagos sofrerão lise ao entrarem em contato com a suspensão de P22HT e se apresentarão com coloração verde-escura, devido à liberação de ácido. Já as células com bacteriófagos em ciclo lisogênico se apresentarão com coloração verde-clara após contato com P22HT, uma vez que essas células estão “imunes” a esse bacteriófago. Um exemplo desse experimento está apresentado na Figura 3.

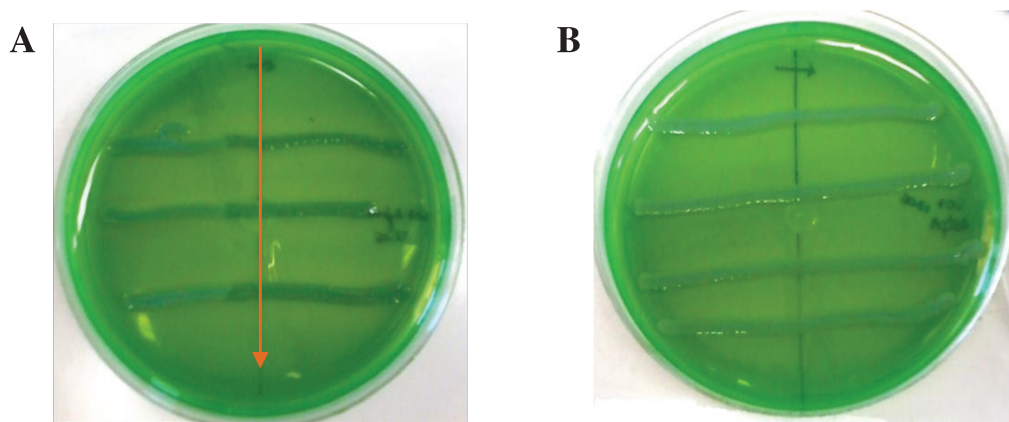


Figura 3. Placas com meio *Mint Green*. As colônias bacterianas foram inoculadas da extremidade esquerda para a direita da placa. **A.** Células de *S. enterica* livres do bacteriófago P22HT. **B.** Células de *S. enterica* com P22HT em ciclo lisogênico. A seta laranja demonstra a reta traçada anteriormente no centro da placa, sobre a qual a suspensão de bacteriófagos P22HT foi espalhada.

4.5.7. Eliminação do gene de resistência

O gene de resistência ao cloranfenicol foi eliminado com o uso do plasmídeo pCP20, como descrito por Datsenko e Wanner (2000). O pCP20 apresenta o gene que codifica a enzima FLP recombinase que reconhece regiões FRT (*FLP Recognition Target*) e é capaz de promover a recombinação entre tais regiões no mesmo genoma, resultando na perda do gene marcador.

As células foram preparadas para transformação, como descrito anteriormente, e então eletroporadas com cerca de 50 a 80 ng de pCP20. Após seleção das colônias em placas de LB-Ágar com ampicilina (20 µg/mL) incubadas a 30°C e confirmação em placas de MacConkey e SS, foi realizada reação de PCR para confirmação de que o gene de resistência havia sido eliminado. Foram utilizados os iniciadores de detecção da deleção gênica (Tabela 3), mas nesse momento o amplificado apresenta menor número de pares de bases em comparação com a construção inicial, onde o gene de resistência se encontrava integrado no genoma.

Para “cura” do plasmídeo pCP20, como ele também apresenta origem de replicação termossensível, tais colônias foram submetidas a crescimento a 43°C e então testadas quanto à perda de resistência a ampicilina.

4.6. Caracterização fenotípica dos mutantes de *S. enterica in vitro*

4.6.1. Curvas de Crescimento

O crescimento bacteriano foi avaliado *in vitro* para verificar possível aumento no tempo de geração (duplicação) dos mutantes comparado às linhagens selvagens. Para isso, foi feito o pré-inóculo das linhagens, selvagem e mutante, no dia anterior à realização da curva, nas condições anteriormente descritas (Item 4.2). Inicialmente, foram inoculados 50 µL do pré-inóculo em um erlenmeyer contendo 50 mL de LB líquido. Após o inóculo, as culturas foram

incubadas sob agitação de 150 rpm e a 37°C. O crescimento foi acompanhado ao longo de 12 horas por meio da leitura da densidade óptica ($\lambda 600$ nm) e pela determinação da quantidade de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) / mL a cada hora. Para a determinação da quantidade de UFC, foi realizado o método de diluição seriada, onde alíquotas de 100 μ L das culturas foram coletadas e diluídas em microtubos contendo 900 μ L de salina (0,85% de cloreto de sódio em água destilada). Ao final, três gotas de 20 μ L das três últimas diluições foram colocadas em placas de meio LB. No dia seguinte, após incubação das placas a 37°C, o número de colônias foi contado e a UFC/mL determinada.

4.6.2. Sobrevivência sob estresse nutricional

A sobrevivência das linhagens mutantes sob estresse nutricional foi comparada a das linhagens selvagens para observação do fenótipo dos mutantes frente a tal situação de estresse. A capacidade de sobreviver sob condições de falta de nutrientes contribui para a virulência e para a persistência bacteriana no ambiente. Inicialmente foi feito o pré-inóculo das linhagens, selvagens e mutantes, no dia anterior à realização do experimento, nas condições anteriormente descritas. Foram inoculados 100 μ L do pré-inóculo em erlenmeyer contendo 50 mL de meio mínimo M9. As culturas foram incubadas sob agitação de 150 rpm e a 37°C. O crescimento foi acompanhado ao longo de cinco dias, em intervalos de 24 horas, por meio da leitura da densidade óptica ($\lambda 600$ nm) e pela determinação da quantidade de UFC (Unidade Formadora de Colônia) / mL a cada dia, conforme metodologia utilizada nas curvas de crescimento.

4.6.3. Sobrevivência em meio com adição de sais biliares

A sobrevivência das linhagens mutantes em meio com adição de sais biliares também foi comparada a das linhagens selvagens. Foi feito o pré-inóculo das linhagens no dia anterior à realização do experimento, nas condições anteriormente descritas (Item 4.2). Foram inoculados 50 µL do pré-inóculo em um erlenmeyer contendo 50 mL (diluição 1/1000) de LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares (*Bile Salts*, Himedia Laboratories). Após o inóculo, as culturas foram incubadas sob agitação de 150 rpm e a 37°C. O crescimento foi acompanhado ao longo de sete horas, por meio da leitura da densidade óptica ($\lambda 600$ nm) a cada hora e pela determinação da quantidade de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) / mL a cada duas horas. Para a determinação da quantidade de UFC, foi realizado o método de diluição seriada. No dia seguinte, após incubação das placas a 37°C, o número de colônias foi contado e a UFC/mL determinada.

4.6.4. Ensaio de Motilidade

O ensaio de motilidade foi realizado a fim de observar como as mutações afetam a motilidade do tipo *swimming* das células. No dia anterior à realização do experimento, foi feito o pré-inóculo das linhagens nas condições anteriormente descritas (Item 4.2). Um número aproximado de células viáveis de cada uma das linhagens (10^6 UFC) foi colocado no centro de uma placa de LB contendo 0,35% de ágar. As placas foram então incubadas a 37°C por 12 horas e a motilidade foi então determinada medindo-se, com auxílio de um paquímetro digital (Starret Company), o diâmetro do halo de migração das bactérias. Foram realizadas duas medidas, uma perpendicular a outra. A migração bacteriana correspondeu a média das duas medidas.

4.7. Caracterização da virulência dos mutantes de *S. enterica* in vivo

Para análise do fenótipo de virulência dos mutantes em comparação com a linhagem selvagem, experimentos para o cálculo da dose letal capaz de matar 50% da população analisada (DL_{50}) foram realizados, seguindo a metodologia de Welkos e O'Brien (1994). Quantidades definidas de UFC (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) foram inoculadas por via oral (gavagem) em camundongos BALB/c/AnUnib, fêmeas com 8 a 10 semanas de idade. Foram utilizados grupos de cinco animais para cada inóculo a ser avaliado. Em cada experimento, um grupo de animais era inoculado com tampão fosfato salina (PBS, 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 em 800 μ L de água destilada, com o pH ajustado para 7,4 com HCl e adição de água destilada para completar o volume de 1 litro) como controle do método experimental. A sobrevivência dos camundongos foi avaliada diariamente ao longo de 30 dias.

No dia anterior à inoculação dos animais, foram realizados pré-inóculos das linhagens mutantes e da linhagem selvagem em LB líquido enriquecido com 0,1% de glicose. Estes foram incubados a 37°C, sem agitação, por 16-18 horas aproximadamente. A próxima etapa consistiu em um inóculo (diluição 1/50) do pré-inóculo em um erlenmeyer contendo 50 mL de LB líquido com 0,1% de glicose. Em seguida, a cultura foi incubada a 37°C, sob agitação de 150 rpm, até que a leitura de densidade ótica ($\lambda 600$ nm) de 0,8 A fosse alcançada. Assim, as células foram centrifugadas a 2000 x g, por 15 minutos, a 4°C (Eppendorf *Centrifuge* 5804R, Rotor F-34-6-38). O sedimento celular foi então ressuspensionado em 10 mL de tampão PBS gelado (4°C). Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. Posteriormente, o sedimento celular foi ressuspensionado em 5 mL de PBS gelado (4°C), e a partir daí, foi realizada diluição seriada também em PBS, para obtenção das diferentes diluições de bactérias a serem inoculadas.

4.8. Análises estatísticas

Os gráficos, bem como os cálculos de UFC/mL e obtenção de planilhas para análise de dados foram realizados utilizando-se o programa *Microsoft Office Excel 2007*. Para análise estatística dos dados obtidos no ensaio de motilidade, foi realizado o teste T de Student, no software “*GraphPad Prism 5*”, onde valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Construção dos mutantes

O presente trabalho teve início com a construção dos mutantes $\Delta stpA$ e $\Delta ybaB$ nas linhagens 662STm e 607STi de *S. enterica*. Primeiramente, foi realizada a eletroporação de uma das linhagens selvagens (607STi) com o plasmídeo pKD46. Em seguida, foi realizada PCR a partir do plasmídeo pKD3 com iniciadores idênticos às sequências flanqueadoras dos genes a serem deletados, tendo como base de dados nosso banco local de sequências de *S. enterica* (dados não publicados). Nessa PCR, foram obtidos os cassetes de recombinação (Figura 4). Foram realizadas diferentes reações, cada uma utilizando um dos dois diferentes pares de iniciadores: stpAP1/stpAP2 e ybaBP1/ybaBP2. Os produtos de PCR foram então purificados, a partir do gel de agarose (Figura 5).

A linhagem 607STi contendo o plasmídeo pKD46 foi então transformada com os cassetes de recombinação. Após seleção em placas contendo cloranfenicol, colônias isoladas foram submetidas à reação de PCR com iniciadores para detecção do gene marcador (Figuras 6 e 7). A linhagem com a deleção de *ybaB* apresentou fragmento de DNA amplificado com aproximadamente 1702 pares de bases (pb), devido à inserção de *cat* e sequências FRT em substituição a sequência original de *ybaB*, enquanto que a linhagem selvagem apresentou fragmento amplificado de 974 pb, correspondendo ao gene *ybaB* e regiões flanqueadoras. Já as linhagens com deleção de *stpA* apresentaram *amplicon* de aproximadamente 1626 pb, enquanto a linhagem selvagem de 995 pb (Figuras 6 e 7). A próxima etapa na construção dos mutantes consistiu em fazer com que as linhagens mutantes perdessem o plasmídeo pKD46.

Após confirmação da “cura” do plasmídeo, foi realizado então o processo de transdução. Assim, as mutações $\Delta ybaB::cat$ e $\Delta stpA::cat$, até então presentes na linhagem 607STi, foram

transferidas para a linhagem selvagem 607STi e também para a linhagem selvagem 662STm, obtendo-se assim os mutantes 607STi $\Delta ybaB::cat$, 607STi $\Delta stpA::cat$, 662STm $\Delta ybaB::cat$ e 662STm $\Delta stpA::cat$ (Figuras 8 e 9).

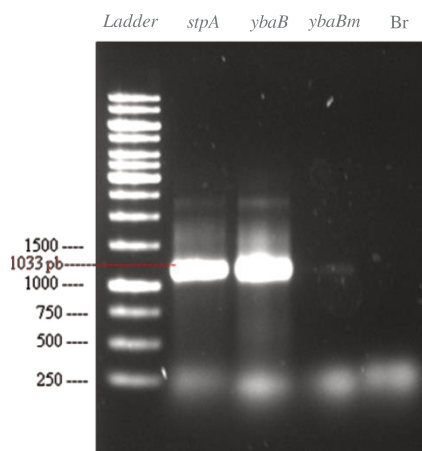


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a amplificação dos cassetes de recombinação a partir do plasmídeo pKD3. Legenda: *Ladder*: marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas); *stpA*: Amplificação com iniciadores stpAP1/stpAP2; *ybaB*: Amplificação com iniciadores ybaBP1/ybaBP2; *ybaBm*: Amplificação com par de iniciadores alternativo ybaBP1m/ybaBP2m, descartado do presente trabalho; Br: Controle negativo da reação (Branco). pb: Pares de Bases.

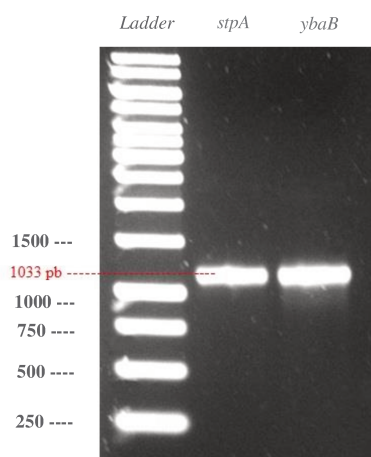


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando os cassetes de recombinação, após etapa de purificação. Legenda: *Ladder*: marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas); *stpA*: Amplificação com iniciadores stpAP1/stpAP2; *ybaB*: Amplificação com iniciadores ybaBP1/ybaBP2. pb: Pares de Bases.

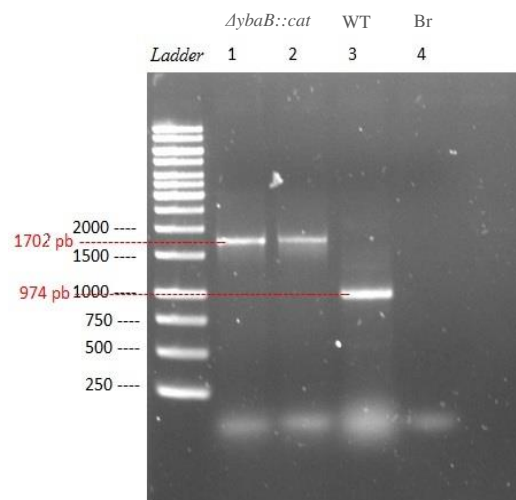


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene *ybaB*. Os iniciadores utilizados nesta reação de PCR foram *ybaBDT-F* e *ybaBDT-R*. Os poços de números 1 e 2 mostram a amplificação de um fragmento de DNA contendo 1702 pb, demonstrando a inserção do cassette de recombinação na linhagem 607STi, em comparação com o amplificado na linhagem selvagem (WT) (poço 3), que apresenta uma banda de 974 pb. Legenda: *Ladder*: marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas); 1: Amplificação a partir de colônia mutante 607STi *ΔybaB::cat*; 2: Amplificação a partir de uma segunda colônia mutante 607STi *ΔybaB::cat*; 3: Amplificação a partir de DNA da linhagem selvagem 607STi WT; 4: Controle negativo da reação (Branco). pb: Pares de Bases.

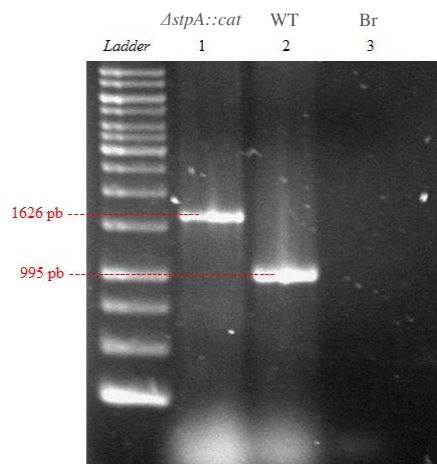


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene *stpA*. Os iniciadores utilizados nesta reação de PCR foram *stpADT-F* e *stpADT-R*. O poço de número 1 mostra a amplificação de um fragmento de DNA contendo 1626 pb, demonstrando a inserção do cassette de recombinação na linhagem 607STi, em comparação com o amplificado na linhagem selvagem (WT) (poço 2), que apresenta uma banda de 995 pb. Legenda: *Ladder*: marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas); 1: Amplificação a partir de colônia mutante isolada 607STi *ΔstpA::cat*; 2: Amplificação a partir de uma colônia selvagem 607STi WT; 3: Controle negativo da reação (Branco). pb: Pares de Bases.

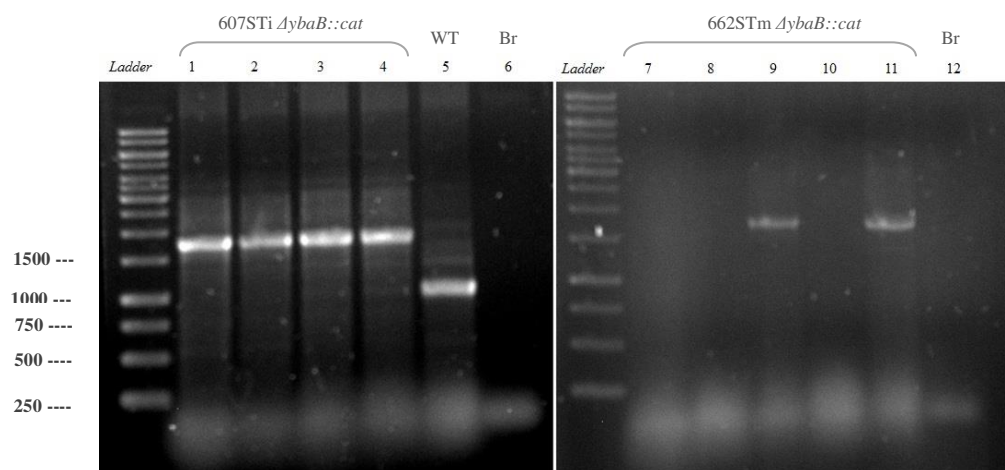


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene *ybaB* após transdução, nas duas linhagens, 607STi e 662STm. Os iniciadores utilizados nesta reação de PCR foram *ybaDT-F* e *ybaBDT-R*. Os poços de números 1 a 4 mostram a amplificação de um fragmento de DNA com aproximadamente 1702 pb, sendo que cada poço representa uma colônia isolada distinta (607STi $\Delta ybaB::cat$). No poço 5, a reação de PCR foi feita com uma colônia selvagem (607STi WT) e é possível a visualização de uma banda menor (974 pb). 6: Controle negativo da reação (Branco). Já os poços de números 7 a 11 mostram a amplificação a partir de células 662STm após transdução. Duas colônias (poços 9 e 11) apresentaram a amplificação esperada no gel (662STm $\Delta ybaB::cat$). 12: Controle negativo da reação (Branco). Legenda: *Ladder*: marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas); pb: Pares de Bases.

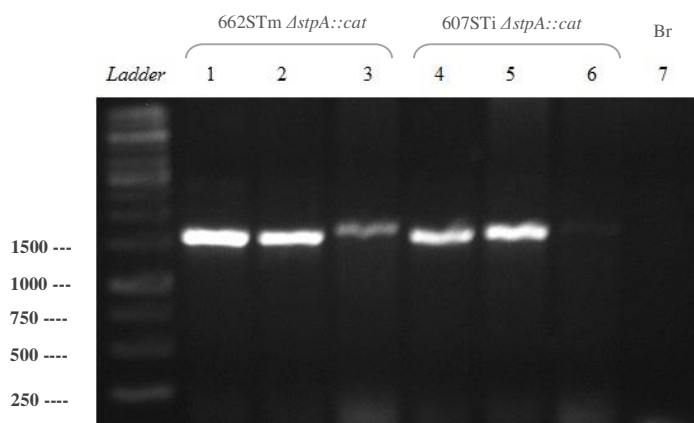


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene *stpA* após transdução, nas duas linhagens, 607STi e 662STm. Os iniciadores utilizados nesta reação de PCR foram *stpADT-F* e *stpADT-R*. Os poços de números 1 a 6 mostram a amplificação de um fragmento de DNA com aproximadamente 1626 pb, sendo que os poços de números 1 a 3 são resultantes da transdução para a linhagem 662STm e os poços de números 4 a 6 correspondem à transdução da mutação para células da linhagem 607STi. Cada poço representa uma colônia isolada distinta. Poço 7: Controle negativo da reação (Branco). Legenda: *Ladder*: marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas); pb: Pares de Bases.

Após transdução, os mutantes foram inoculados em placas de meio *Mint Green*. Foram obtidas colônias isoladas livres de bacteriófagos P22HT para as quatro linhagens mutantes: 607STi $\Delta ybaB::cat$, 607STi $\Delta stpA::cat$, 662STm $\Delta ybaB::cat$ e 662STm $\Delta stpA::cat$ (Figura 10). Na figura abaixo se pode notar que após transdução foi possível isolar colônias livres de bacteriófagos, para todas as linhagens mutantes construídas.

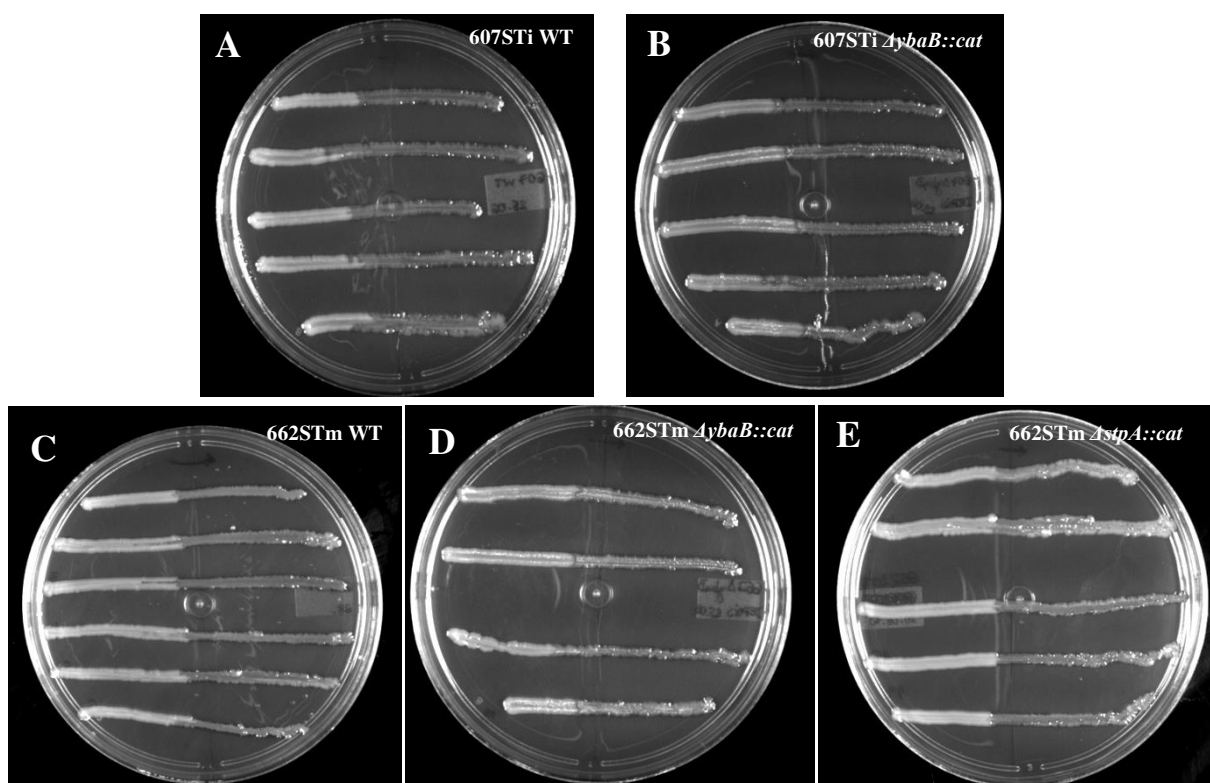


Figura 10. Placas de meio *Mint Green* inoculadas com as linhagens: **A.** 607STi WT; **B.** 607STi $\Delta ybaB::cat$; **C.** 662STm WT; **D.** 662STm $\Delta ybaB::cat$ e **E.** 662STm $\Delta stpA::cat$. Imagens capturadas em aparelho de fotodocumentação (*Gel Logic*, Carestream, USA). Apenas a imagem da placa com a linhagem 607STi $\Delta stpA::cat$ não foi capturada.

O próximo passo consistiu em eliminar o gene de resistência ao cloranfenicol, utilizando-se para isso o plasmídeo pCP20. Esse plasmídeo codifica FLP recombinase, a qual é capaz de promover a recombinação entre as regiões FRT (FLP *Recognition Target*) presentes nas extremidades dos cassetes de recombinação, eliminando assim o gene que confere resistência ao cloranfenicol (*cat*). Tal recombinação resulta na perda de cerca de 930 pb. Todas as quatro linhagens mutantes construídas foram transformadas com pCP20, porém houve perda da resistência em apenas três linhagens mutantes: 607STi *ΔybaB::cat*, 662STm *ΔybaB::cat* e 662STm *ΔstpA::cat*, as quais passaram a ser identificadas como 607STi *ΔybaB*, 662STm *ΔybaB* e 662STm *ΔstpA* (Figuras 11 e 12). A perda de resistência foi confirmada por PCR através da verificação da perda do gene *cat*.

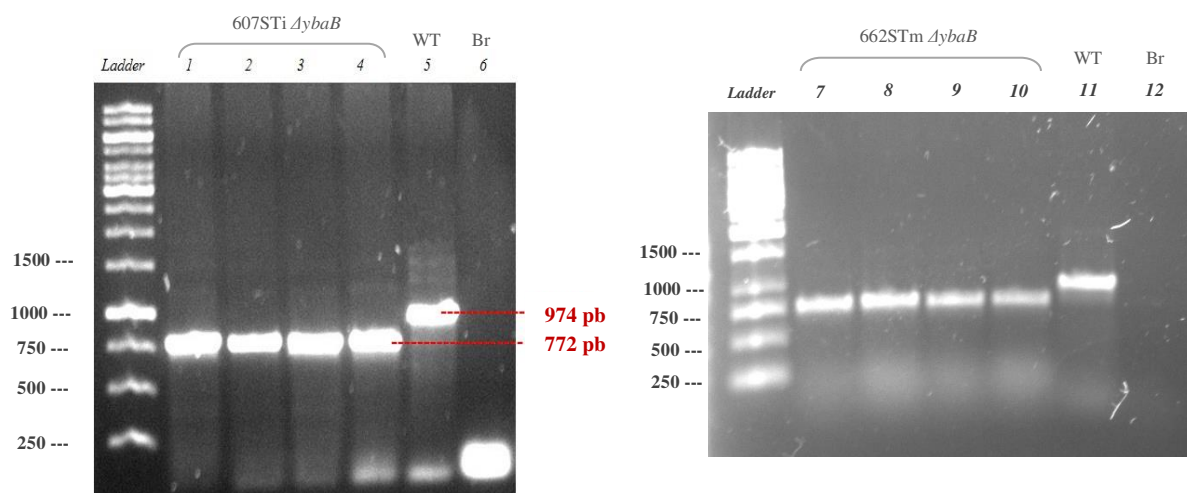


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene que confere resistência ao cloranfenicol (*cat*) nas linhagens mutantes 607STi *ΔybaB* e 662STm *ΔybaB*. Os iniciadores utilizados nesta reação de PCR foram: ybaBDT-F e ybaBDT-R. Os poços de números 1 a 4 mostram a amplificação de um fragmento de DNA que corresponde à região genômica sem o gene alvo *ybaB* e também sem o gene *cat* (Cloranfenicol acetil transferase). O poço 5 corresponde à amplificação na linhagem selvagem (607STi WT). Cada poço representa uma colônia isolada distinta. Poço 6: Controle negativo da reação (Branco). Já os poços de números 7 a 10 mostram a eliminação do gene de resistência em 662STm *ΔybaB*. Poço 11: amplificação na linhagem selvagem 662STm. Poço 12: Controle negativo da reação (Branco). Legenda: *Ladder*: marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas); pb: Pares de Bases.

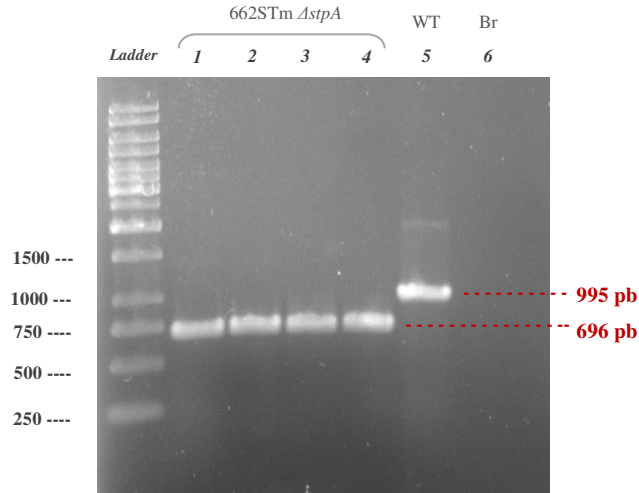


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando a deleção do gene que confere resistência ao cloranfenicol (*cat*) na linhagem mutante 662STm $\Delta stpA$. Os iniciadores utilizados nesta reação de PCR foram: stpADT-F e stpADT-R. Os poços de números 1 a 4 mostram a amplificação de um fragmento de DNA que corresponde à região genômica sem o gene alvo *stpA* e também sem o gene *cat*. O poço 5 corresponde à amplificação na linhagem selvagem (662STm WT). Cada poço representa uma colônia isolada distinta. Poço 6: Controle negativo da reação (Branco). Legenda: *Ladder*: marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas); pb: Pares de Bases.

Foram feitas algumas tentativas para retirada da resistência da linhagem 607STi $\Delta stpA::cat$, processando-se algumas alterações no protocolo de preparo de células eletrocompetentes, mas ainda não se obteve sucesso neste procedimento.

5.2. Caracterização fenotípica dos mutantes *in vitro*

5.2.1. Curvas de Crescimento

As linhagens mutantes foram caracterizadas quanto às curvas de crescimento para observação do efeito das mutações sobre o crescimento de *S. enterica*. Foram realizadas triplicatas das curvas de crescimento de cada uma das linhagens mutantes, 662STm $\Delta ybaB$, 662STm $\Delta stpA$, 607STi $\Delta ybaB$ e 607STi $\Delta stpA::cat$ e o gráfico mais representativo de cada linhagem está apresentado nas Figuras 13 a 16.

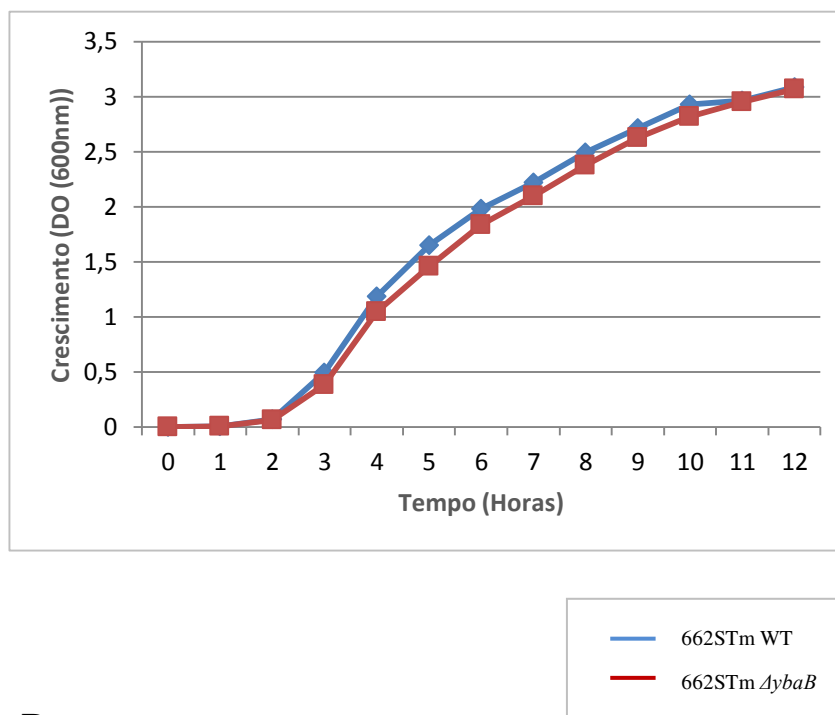
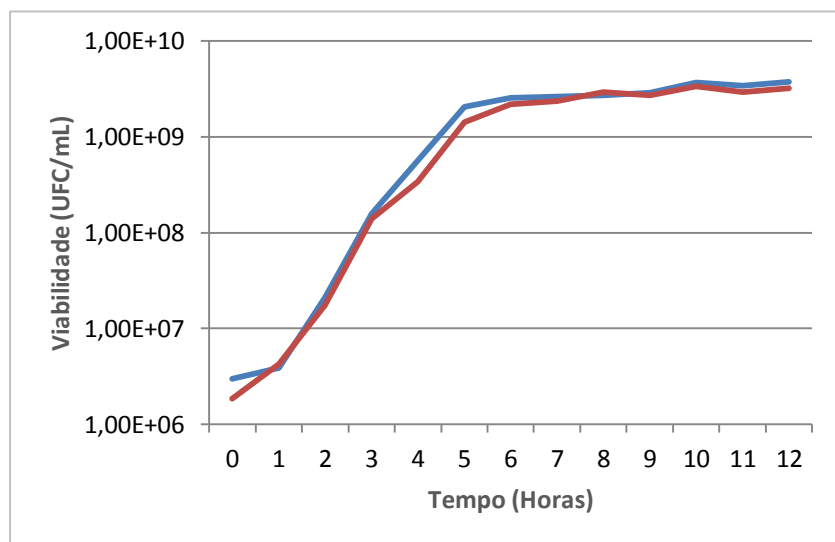
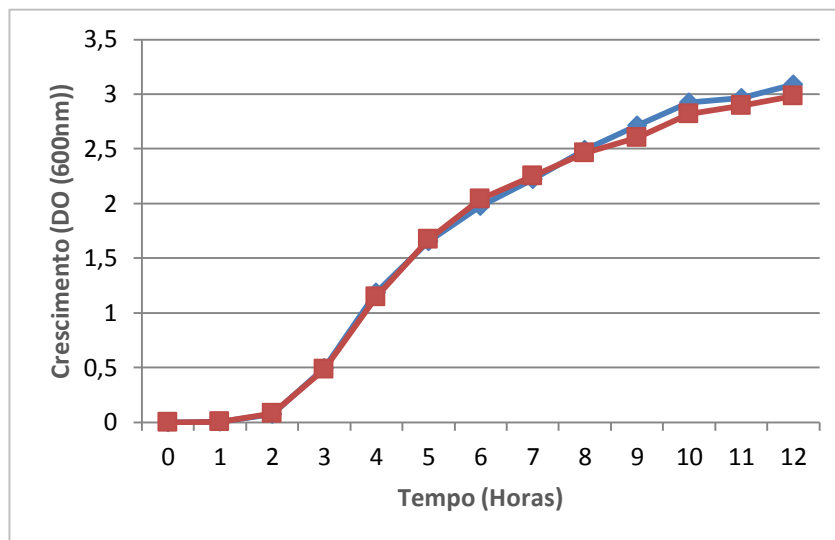
A**B**

Figura 13. Curvas de crescimento em meio de cultura LB das linhagens 662STm WT e 662STm $\Delta ybaB$ durante 12 horas. **A.** Curvas baseadas na leitura da densidade ótica (DO_{λ600 nm}). **B.** Curvas baseadas na aplicação do log sobre o número de células viáveis (UFC/mL).

A



B

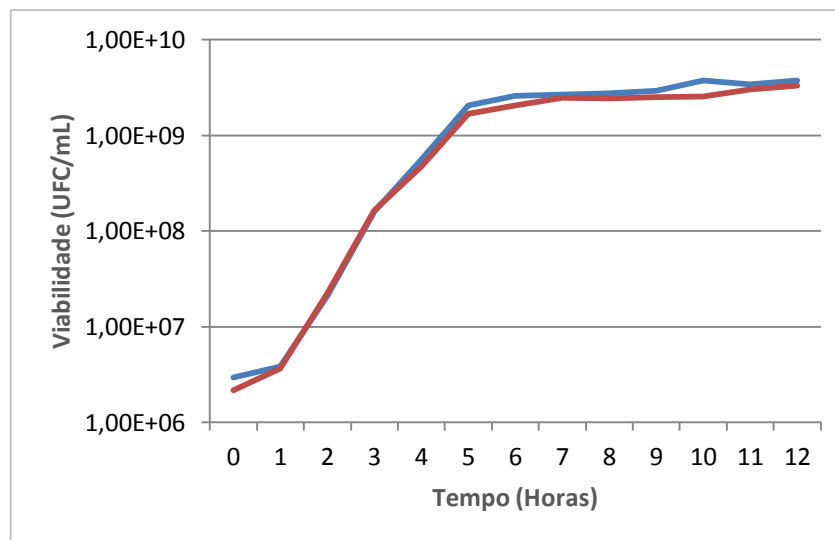


Figura 14. Curvas de crescimento em meio de cultura LB das linhagens 662STm WT e 662STm $\Delta stpA$ durante 12 horas. **A.** Curvas baseadas na leitura da densidade ótica (DO_{600 nm}). **B.** Curvas baseadas na aplicação do log sobre o número de células viáveis (UFC/mL).

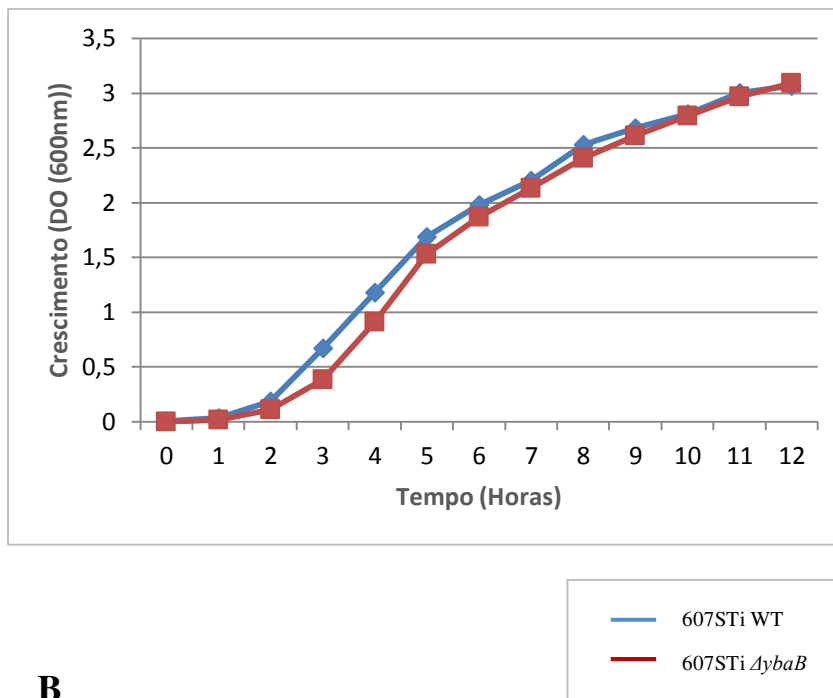
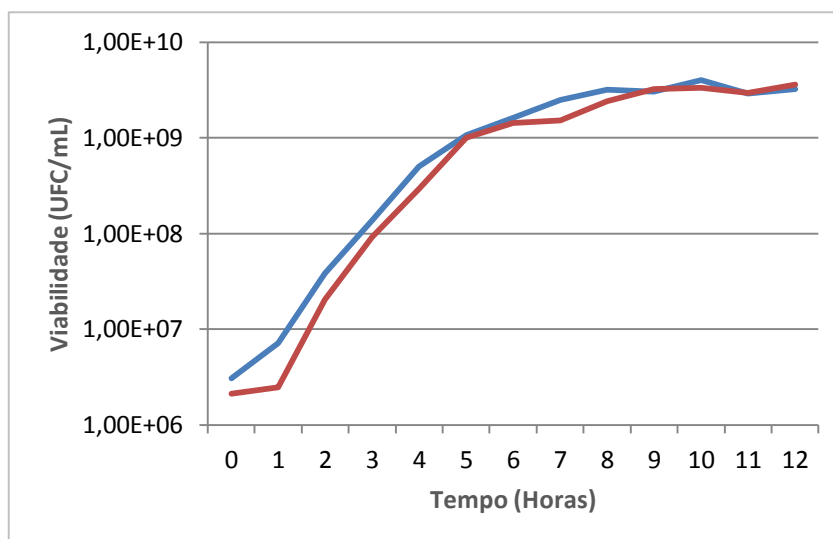
A**B**

Figura 15. Curvas de crescimento em meio de cultura LB das linhagens 607STi WT e 607STi $\Delta ybaB$ durante 12 horas. **A.** Curvas baseadas na leitura da densidade ótica (DO_{600 nm}). **B.** Curvas baseadas na aplicação do log sobre o número de células viáveis (UFC/mL).

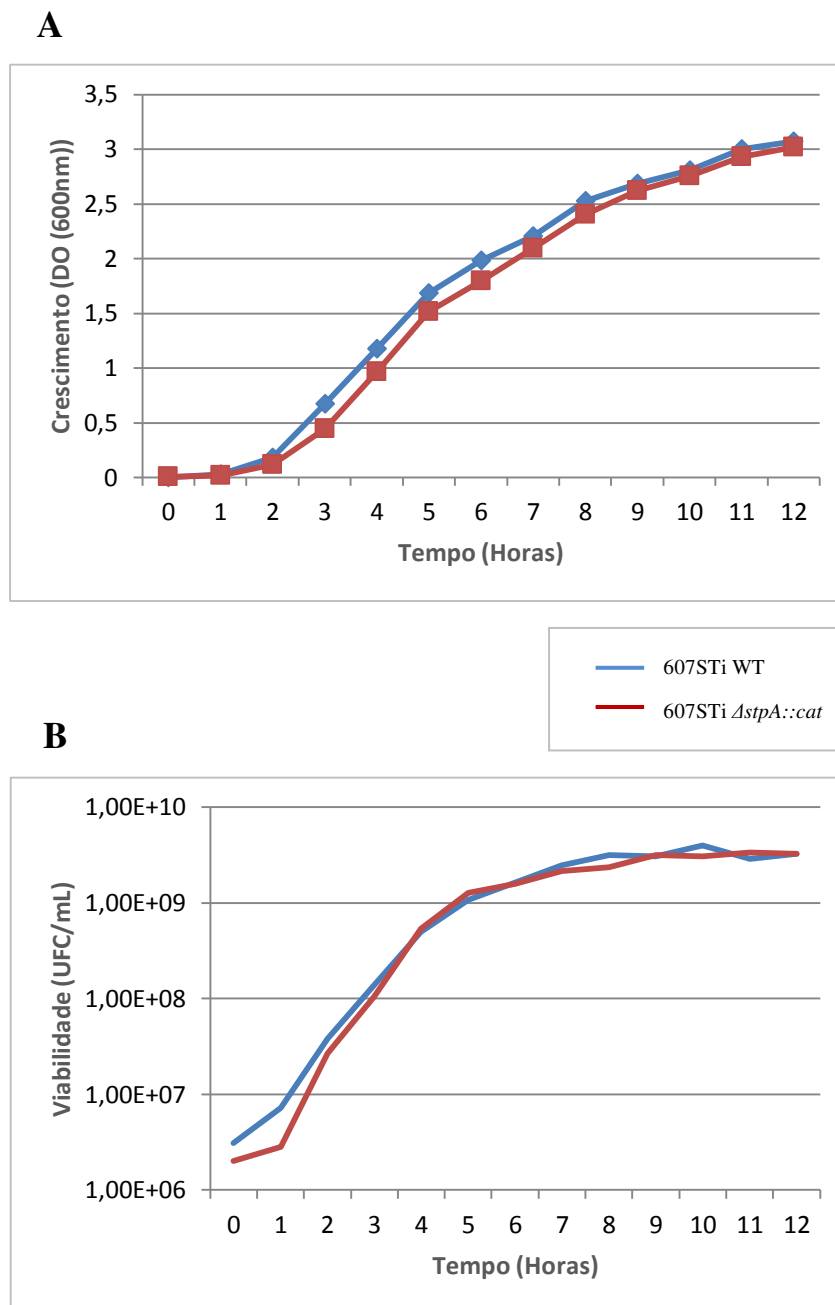


Figura 16. Curvas de crescimento em meio de cultura LB das linhagens 607STi WT e 607STi $\Delta stpA::cat$ durante 12 horas. **A.** Curvas baseadas na leitura da densidade ótica (DO_{λ600 nm}). **B.** Curvas baseadas na aplicação do log sobre o número de células viáveis (UFC/mL).

Como podemos observar nos gráficos de curvas de crescimento, tanto se considerarmos valores de DO quanto de UFC/mL, a taxa de crescimento dos mutantes foi muito próxima a observada pelas linhagens selvagens correspondentes. Todas as linhagens chegaram às diferentes fases de crescimento em tempos muito similares.

Avaliando-se os resultados obtidos por contagem de UFC/mL, foi possível concluir que as linhagens, mutantes ou selvagens, atingem a fase estacionária após 5 a 7 horas de crescimento. Também não foram observados aumentos significativos na fase *lag* de crescimento dos mutantes em comparação as linhagens parentais. Com bases nesses dados, é possível sugerir que os produtos dos genes *ybaB* e *stpA* não são essenciais para o crescimento de *S. enterica*.

5.2.2. Sobrevivência sob estresse nutricional

Com relação à sobrevivência sob estresse nutricional em meio mínimo M9, ao observar-se o número de células viáveis (UFC/mL), pode-se visualizar que com o passar dos dias, o número de células viáveis das linhagens mutantes 662STm $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta stpA$ se mantém próximo ao observado para a linhagem selvagem 662STm WT (Tabela 4). Outra importante observação foi em relação ao início de formação de biofilme na parede do erlenmeyer para as culturas 662STm WT e 662STm $\Delta stpA$, já após 24 horas de cultivo, o qual não foi observado no erlenmeyer com a cultura 662STm $\Delta ybaB$ (Figura 17). Esses resultados são preliminares, pois o experimento foi realizado uma única vez e apenas para a linhagem 662STm.

Tabela 4. Contagem de células viáveis (UFC/mL) das linhagens 662STm WT, 662STm $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta stpA$ sob estresse nutricional em intervalos de 24 horas durante cinco dias de incubação. O cultivo foi realizado em meio mínimo M9 (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

Linhagem	0h	24h	48h	72h	4 dias	5 dias
662 WT	2,42E+06	2,95E+09	3,3E+09	3,38E+09	5,25E+09	3,53E+09
662 $\Delta ybaB$	2,05E+06	3,18E+09	3,07E+09	2,95E+09	3,50E+09	2,02E+09
662 $\Delta stpA$	2,27E+06	2,68E+09	3,43E+09	4,02E+09	4,97E+09	4,03E+09

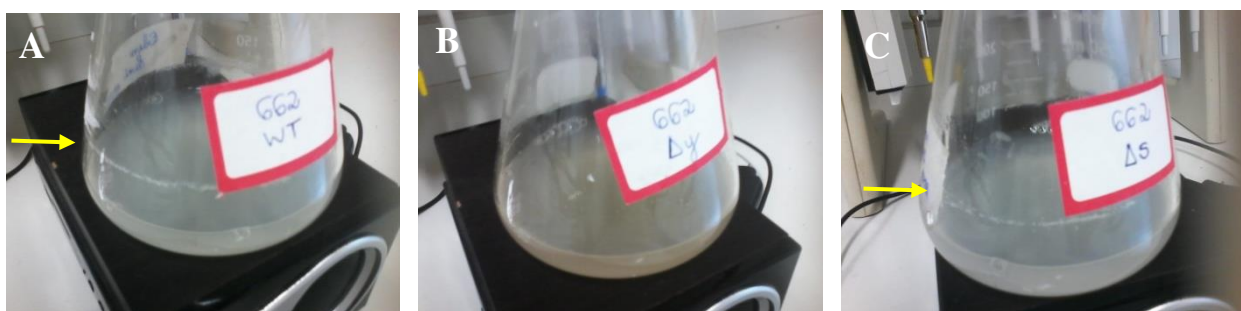
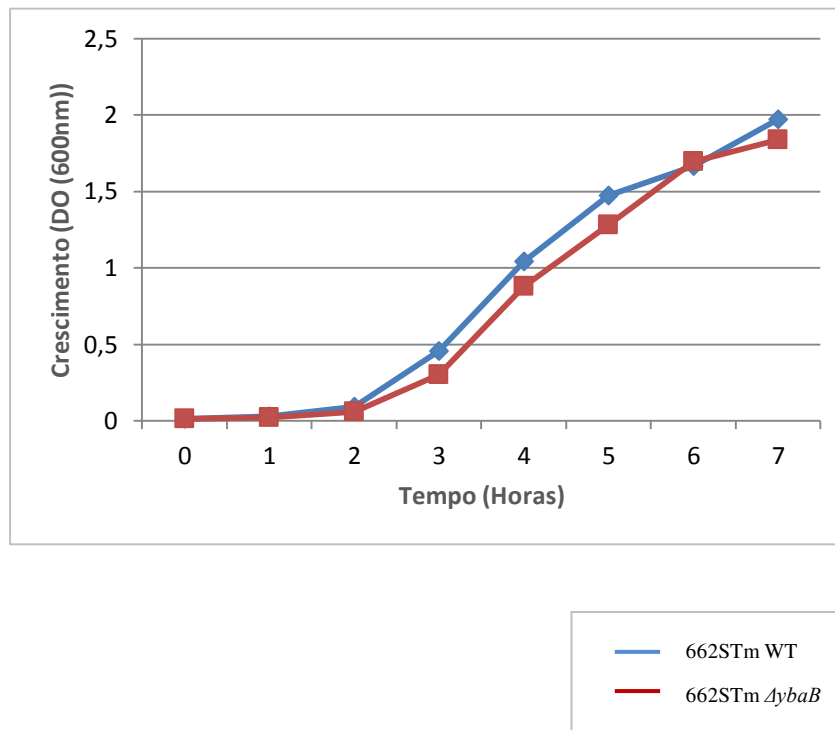


Figura 17. Culturas 662STm WT, 662STm $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta stpA$ inoculadas em meio mínimo M9 ao final dos cinco dias de experimento. **A.** 662STm WT. **B.** 662STm $\Delta ybaB$. **C.** 662STm $\Delta stpA$. A seta demonstra o início de formação de biofilme na parede do erlenmeyer.

5.2.3. Sobrevivência em meio com adição de sais biliares

Algumas bactérias são capazes de sobreviver à bile e *S. enterica* é um exemplo de patógeno resistente a esse fluido (HERNANDEZ *et al.*, 2012). A fim de analisar se as linhagens mutantes construídas tornaram-se menos resistentes ou mesmo sensíveis aos sais biliares, foram realizados experimentos de sobrevivência em meio com adição de tais sais. Como é possível observar nas Figuras 18 a 21, a presença de sais biliares no meio de cultura (0,5%) não afetou o crescimento das linhagens mutantes 662STm $\Delta ybaB$, 662STm $\Delta stpA$, 607STi $\Delta ybaB$ e 607STi $\Delta stpA::cat$, em comparação com as linhagens selvagens correspondentes.

A



B

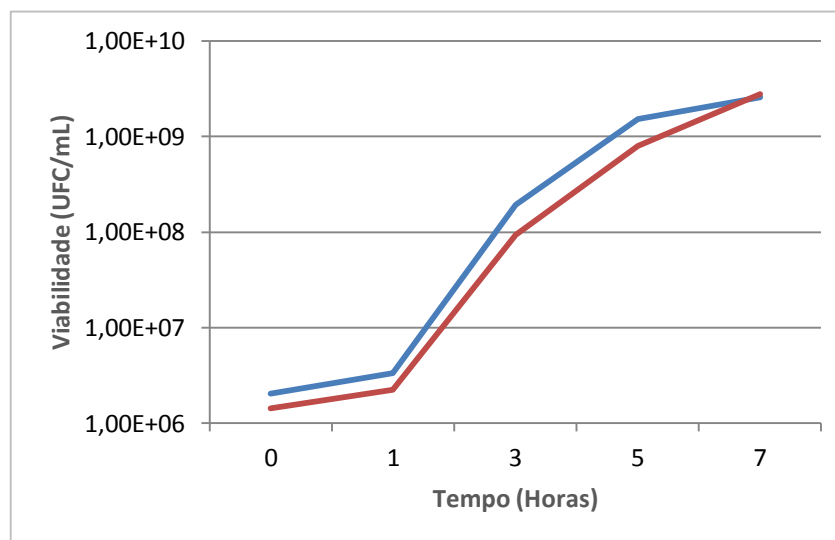


Figura 18. Crescimento das linhagens 662STm WT e 662STm $\Delta ybaB$ durante 7 horas em meio LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares. **A.** Curvas baseadas na leitura da densidade ótica ($DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$). **B.** Curvas baseadas na aplicação do log sobre o número de células viáveis (UFC/mL).

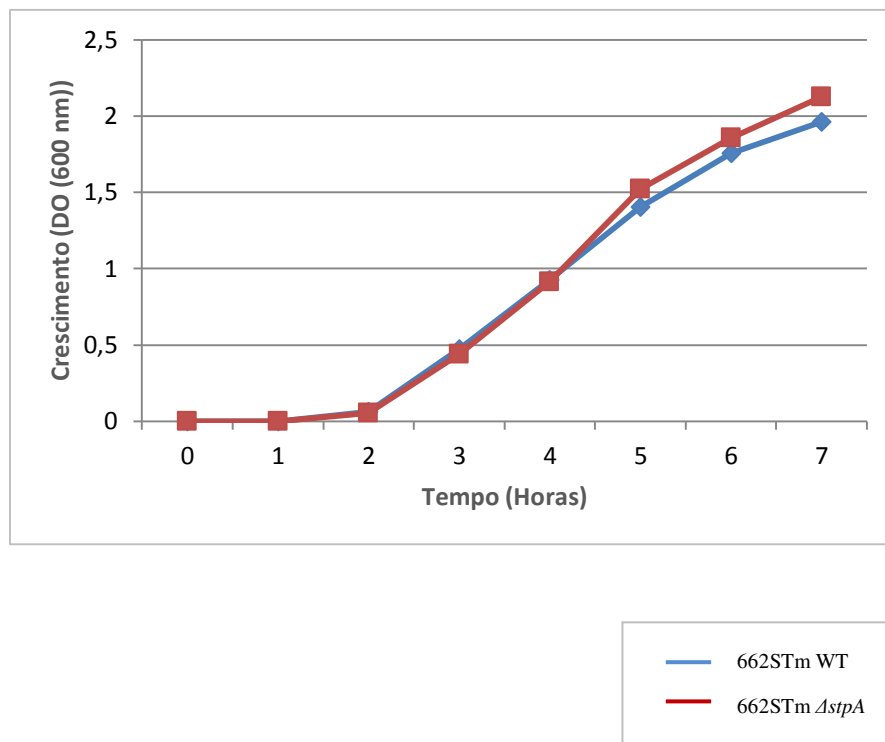
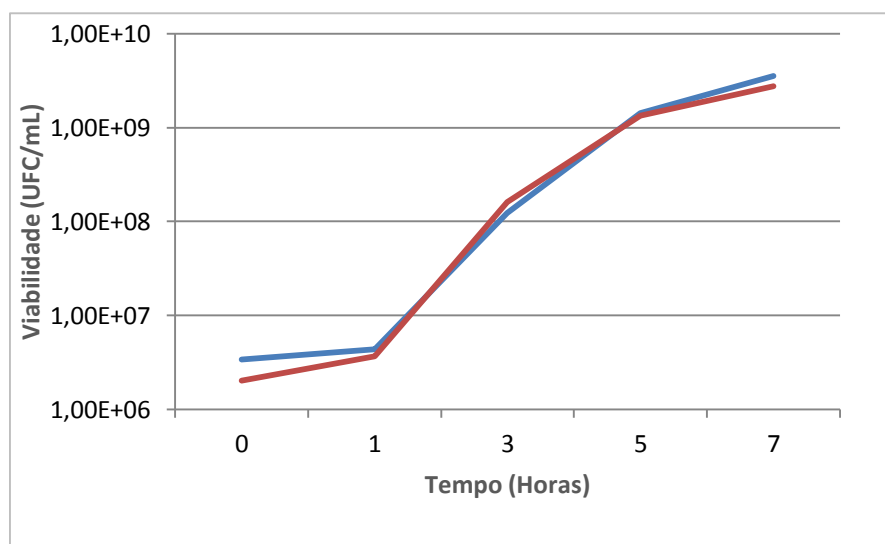
A**B**

Figura 19. Crescimento das linhagens 662STm WT e 662STm $\Delta stpA$ durante 7 horas em meio LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares. **A.** Curvas baseadas na leitura da densidade ótica ($DO_{\lambda 600\text{ nm}}$). **B.** Curvas baseadas na aplicação do log sobre o número de células viáveis (UFC/mL).

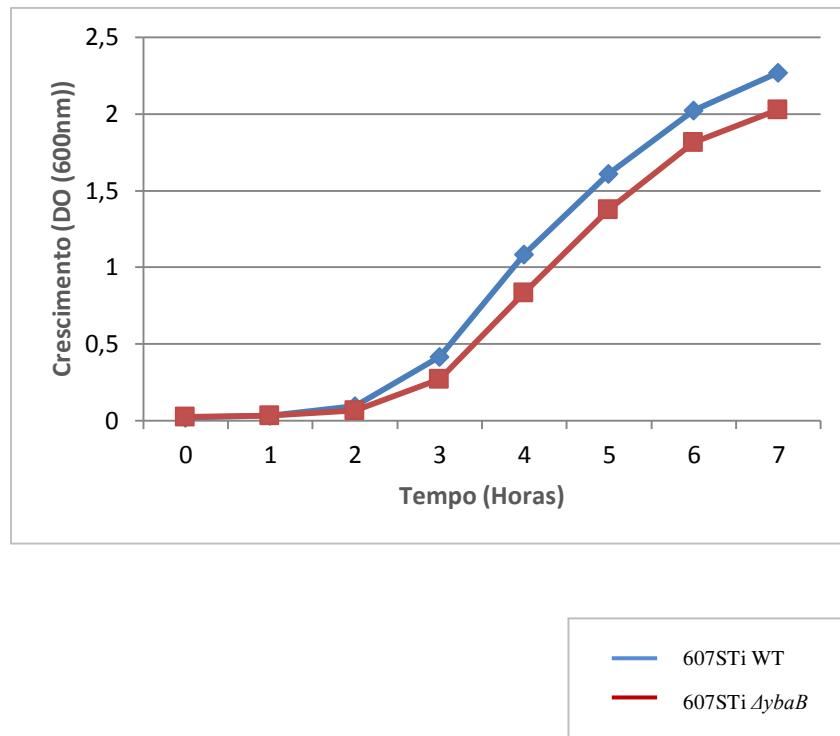
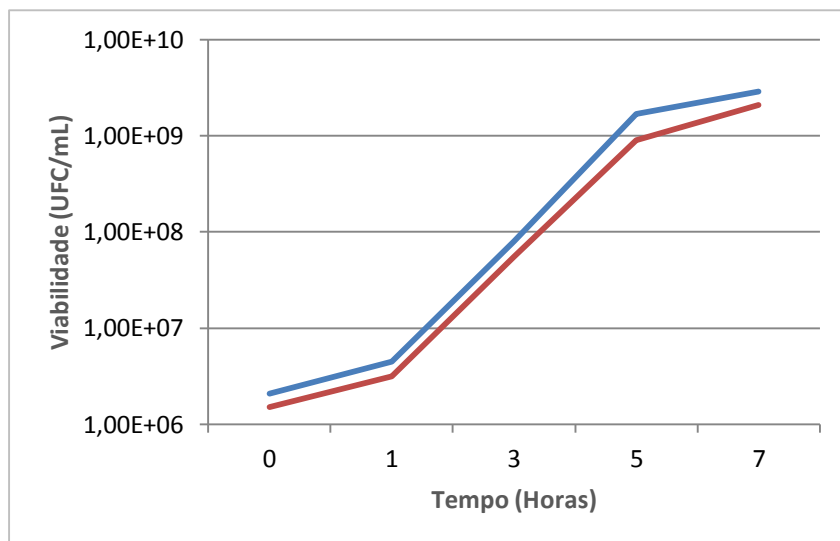
A**B**

Figura 20. Crescimento das linhagens 607STi WT e 607STi $\Delta ybaB$ durante 7 horas em meio LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares. **A.** Curvas baseadas na leitura da densidade ótica ($DO_{\lambda 600 \text{ nm}}$). **B.** Curvas baseadas na aplicação do log sobre o número de células viáveis (UFC/mL).

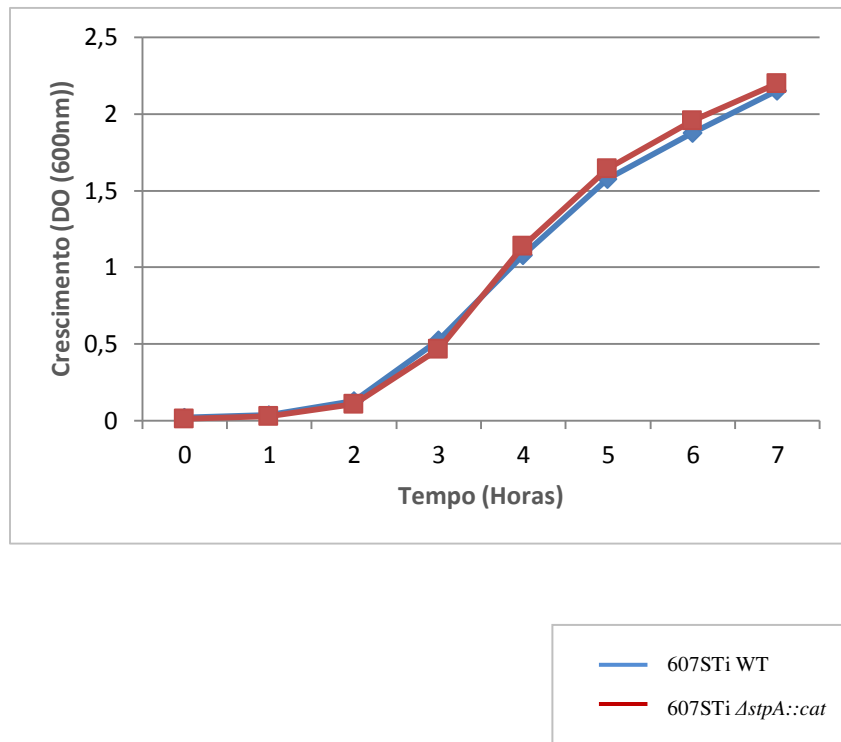
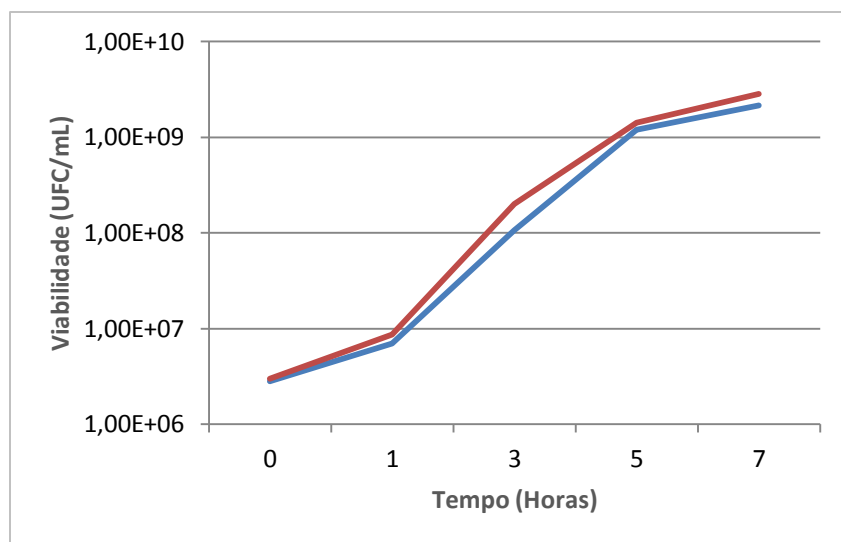
A**B**

Figura 21. Crescimento das linhagens 607STi WT e 607STi $\Delta stpA::cat$ durante 7 horas em meio LB líquido com adição de 0,5% de sais biliares. **A.** Curvas baseadas na leitura da densidade ótica (DO_{λ600 nm}). **B.** Curvas baseadas na aplicação do log sobre o número de células viáveis (UFC/mL).

5.2.4. Ensaio de Motilidade

Para observar se as mutações afetam a motilidade das células, ensaios de motilidade foram realizados. Para as linhagens 662STm $\Delta ybaB$ e 607STi $\Delta ybaB$ foi possível observar que, de modo geral, o halo de migração da bactéria mutante apresentou menores valores em comparação com a linhagem selvagem (Figuras 22 e 23). Para a linhagem 662STm $\Delta ybaB$, em dois experimentos distintos, os resultados foram similares, mas somente em um deles as diferenças foram estatisticamente significantes, embora no segundo experimento, o valor de p foi muito próximo a 0,05 (Tabela 5). Embora preliminares, esses dados sugerem que o produto do gene $ybaB$ afeta a motilidade. Novas repetições desse experimento, com um número maior de placas, são necessárias para confirmar de forma definitiva tal observação.

Tabela 5. Medidas em milímetros do halo de migração das linhagens 662STm WT e 662STm $\Delta ybaB$ durante ensaio de motilidade.

	Experimento 1		Experimento 2	
	662STm WT	662STm $\Delta ybaB$	662STm WT	662STm $\Delta ybaB$
Placa 1	62,24	38,20	74,26	51,29
Placa 2	61,13	37,29	75,72	52,42
Placa 3	53,54	43,88	65,49	65,63
Placa 4	-	-	64,13	56,32
	$p = 0,0282$		$p = 0,0514$	

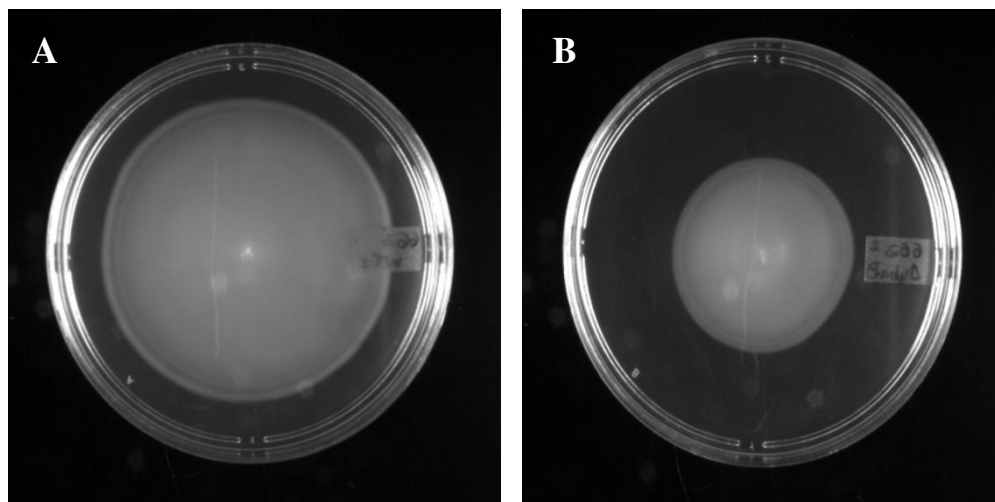


Figura 22. Culturas representativas da migração de *S. enterica* em meio LB semi-sólido para avaliação da motilidade. As culturas foram incubadas 12 horas antes da medição do diâmetro dos halos. **A.** Placa inoculada com a linhagem 662STm WT. **B.** Placa inoculada com a linhagem 662STm $\Delta ybaB$.

Para a linhagem 607STi $\Delta ybaB$, foram realizados três experimentos distintos sendo que em dois experimentos as diferenças de migração foram significantes entre o mutante e a linhagem selvagem (Figura 23), enquanto que em um dos experimentos, o valor de p (0,1339) foi superior a 0,05 (Tabela 6). Estes resultados reforçam a observação de que o produto de *ybaB* afeta a motilidade. No entanto, como salientado, tais experimentos devem ser repetidos com um número maior de culturas.

Tabela 6. Medidas em milímetros do halo de migração das linhagens 607STi WT e 607STi $\Delta ybaB$ durante ensaio de motilidade.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		Experimento 4	
	607 WT	607 $\Delta ybaB$	607 WT	607 $\Delta ybaB$	607 WT	607 $\Delta ybaB$	607 WT	607 $\Delta ybaB$
Placa 1	50,91	40,46	51,72	44,62	50,06	42,99	63,23	54,42
Placa 2	52,21	40,58	48,20	45,12	44,58	38,74	68,03	52,24
Placa 3	-	-	49,35	45,29	44,51	42,00	71,73	63,48
Placa 4	-	-	42,73	43,58	-	-	66,28	58,29
$p = 0,1339$ $p = 0,0318$ $p = 0,006$								

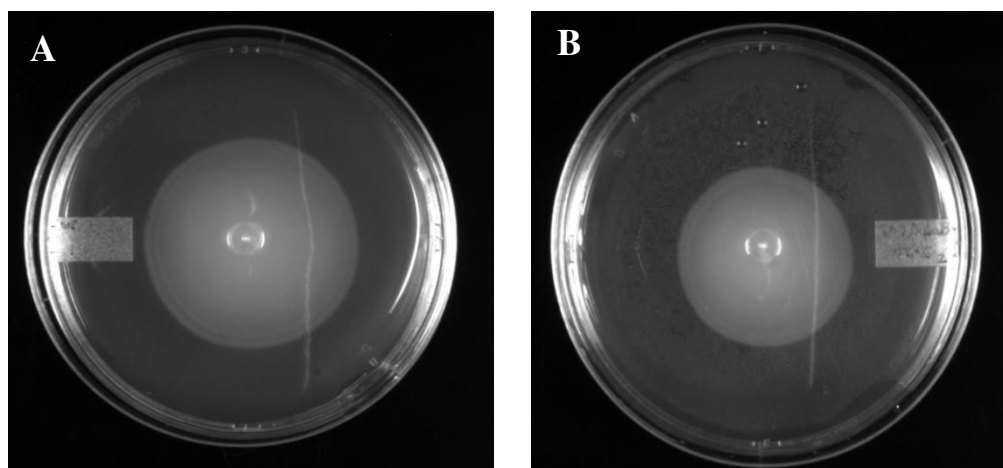


Figura 23. Culturas representativas da migração de *S. enterica* em meio LB semi-sólido para avaliação da motilidade. As culturas foram incubadas 12 horas antes da medição do diâmetro dos halos. **A.** Placa inoculada com a linhagem 607STi WT. **B.** Placa inoculada com a linhagem 607STi $\Delta ybaB$.

Com relação aos mutantes para o gene *stpA*, o ensaio foi realizado apenas com a linhagem 607STi Δ *stpA::cat* (Figura 24). Os resultados indicaram que a deleção deste gene não afetou de modo significativo a motilidade das células.

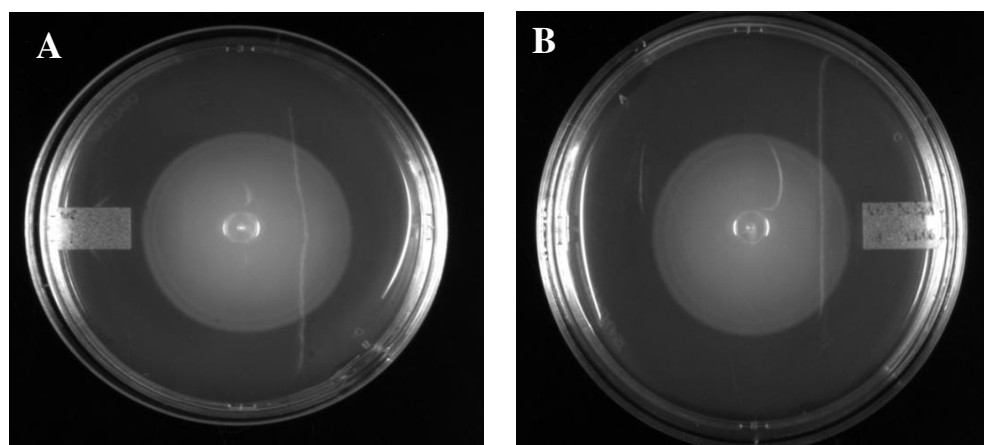


Figura 24. Culturas representativas da migração de *S. enterica* em meio LB semi-sólido para avaliação da motilidade. As culturas foram incubadas 12 horas antes da medição do diâmetro dos halos. **A.** Placa inoculada com a linhagem 607STi WT. **B.** Placa inoculada com a linhagem 607STi Δ *stpA::cat*.

5.3. Caracterização fenotípica dos mutantes de *S. enterica in vivo*

Para analisar o fenótipo de virulência dos mutantes, a dose letal média (DL₅₀) foi avaliada no modelo murino de infecção. Tal experimento foi realizado para cada uma das linhagens 662STm WT, 662STm Δ *ybaB*, 662STm Δ *stpA*, 607STi WT e 607STi Δ *ybaB*. Apenas a linhagem 607STi Δ *stpA::cat* não foi testada em modelo murino, pois não houve tempo hábil para a realização de tal experimento após as tentativas de eliminação do gene que confere resistência ao cloranfenicol nesta linhagem.

Os experimentos de DL₅₀ para as linhagens selvagens (662STm WT e 607STi WT) foram realizados apenas uma vez já que estudos anteriores realizados em nosso laboratório com tais linhagens já haviam obtido esses resultados, tornando desnecessária a utilização de animais para realizarmos repetições desses experimentos. É importante ressaltar que os valores de DL₅₀ para as linhagens selvagens obtidas no presente trabalho são próximos aos observados em estudos anteriores (dados não publicados). Para as linhagens 662STm $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta stpA$ foram realizados experimentos em triplicata e para 607STi $\Delta ybaB$, duplicata. Os resultados obtidos estão nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. DL₅₀ de linhagens de *S. enterica* Typhimurium 662STm WT, 662STm $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta stpA$ inoculadas via oral em camundongos BALB/c/AnUnib.

Linhagem	DL₅₀	Intervalo de confiança
662STm WT	$1,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^1$ a $2,8 \times 10^4$
662STm $\Delta ybaB$ (Experimento 1)	$1,5 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$ a $4,3 \times 10^5$
662STm $\Delta ybaB$ (Experimento 2)	$1,8 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^4$
662STm $\Delta ybaB$ (Experimento 3)	$7,5 \times 10^4$	$9,8 \times 10^3$ a $5,8 \times 10^5$
662STm $\Delta stpA$ (Experimento 1)	$6,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$ a $4,4 \times 10^4$
662STm $\Delta stpA$ (Experimento 2)	$2,0 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$ a $9,5 \times 10^4$
662STm $\Delta stpA$ (Experimento 3)	$3,2 \times 10^3$	$5,8 \times 10^2$ a $1,7 \times 10^4$

Tabela 8. DL₅₀ de linhagens de *S. enterica* 607STi WT e 607STi $\Delta ybaB$ inoculadas via oral em camundongos BALB/c/AnUnib.

Linhagem	DL₅₀	Intervalo de confiança
607STi WT	8,0 x 10 ³	1,2 x 10 ³ a 5,4 x 10 ⁴
607STi $\Delta ybaB$ (Experimento 1)	4,2 x 10 ⁴	6,7 x 10 ³ a 2,6 x 10 ⁵
607STi $\Delta ybaB$ (Experimento 2)	5,0 x 10 ³	1,2 x 10 ³ a 2,1 x 10 ⁴

Não é possível descartar que os genes *stpA* e *ybaB* desempenhem funções relacionadas a patogenicidade no modelo murino. No entanto, os dados obtidos indicam que estes genes não são essenciais à patogenicidade, uma vez que os valores de DL₅₀ dos mutantes foram muito próximos da linhagem selvagem.

6. DISCUSSÃO

Considerando que *S. enterica* é um patógeno importante do ponto de vista da saúde pública mundial, o estudo dessa bactéria é relevante já que o conhecimento de sua fisiologia torna plausível o desenvolvimento de estratégias para redução ou mesmo eliminação dessa bactéria nos diferentes ambientes nos quais pode ser encontrada. A identificação e caracterização de fatores de virulência em *S. enterica* podem ajudar no desenvolvimento de medidas para o controle de salmonelose (SHIPPY *et al.*, 2013). Além disso, esta bactéria constitui um excelente modelo biológico de estudo.

Dentre os sorovares de *S. enterica*, o sorovar Typhimurium é considerado modelo de estudo para a patogenicidade (DORMAN, 2009), daí nossa escolha por trabalharmos principalmente com uma linhagem Typhimurium (662STm). A escolha por um segundo sorovar, derivado de Typhimurium, *S. enterica* I 4,[5],12:i:- ocorreu para que pudéssemos observar as características fenotípicas resultantes das deleções gênicas em dois diferentes *backgrounds* genéticos.

No nosso trabalho foi avaliado o papel de duas NAPs sobre os mecanismos de virulência de *S. enterica*, bem como sua influência sobre a fisiologia celular bacteriana, em diferentes condições ambientais. Para isso, foi realizada a deleção dos genes responsáveis pela expressão dessas NAPs, para subsequente observação do fenótipo na ausência de tais proteínas.

As NAPs podem influenciar tanto a estrutura do nucleóide bacteriano quanto a regulação gênica, podendo inclusive exercer ambos os papéis ao mesmo tempo (DILLON e DORMAN, 2010). Esse grupo de proteínas pode atuar tanto como ativadoras quanto repressoras da transcrição de genes, sendo que a composição de proteínas associadas ao nucleóide muda de acordo com as condições ou fases de crescimento da célula bacteriana (AZAM e ISHIHAMA,

1999). Assim, a compreensão do papel de reguladores globais, tais como NAPs, sobre genes relacionados com a virulência de *S. enterica*, possibilitam que linhagens atenuadas possam ser construídas, alterando-se tal mecanismo de virulência.

Estudos sugerem que variações nos níveis de enovelamento do DNA podem influenciar a regulação de genes *housekeeping* e também genes relacionados à virulência (DORMAN, 1991). Há evidências experimentais de que os estresses ambientais encontrados por bactérias como alterações da osmolaridade, pH e temperatura podem modular o enovelamento do DNA (DORMAN, 2006), por isso torna-se importante o estudo das NAPs, para que possamos compreender seu papel sobre outros genes.

A avaliação do crescimento *in vitro* das linhagens mutantes foi importante para verificar se a ausência do produto dos genes em questão (*stpA* ou *ybaB*) poderia ou não afetar a taxa de crescimento comparado a linhagem parental e ainda, para verificar se as diferentes etapas de crescimento (fase lag, fase exponencial e fase estacionária) sofrem alteração com a ausência da atividade desses genes.

Curvas de crescimento são importantes, pois há correlação entre a fase de crescimento em que a célula se encontra e a expressão gênica. A atividade transcricional varia de acordo com o estado fisiológico da célula. Bactérias em fase exponencial têm maior atividade transcricional, especialmente de genes que codificam componentes ribossomais e outros componentes da maquinaria de tradução e replicação. Quando o crescimento das bactérias diminui, como acontece durante a fase estacionária de crescimento há menos atividade de transcrição. (DILLON e DORMAN, 2010). Como não foram observadas diferenças nas curvas de crescimento dos mutantes em relação à linhagem parental correspondente, podemos sugerir que tais NAPs não são

imprescindíveis para o processo de condensação do DNA nas diferentes fases de crescimento bacteriano.

Com relação aos resultados observados nas curvas de crescimento para as linhagens com deleção de *stpA*, Ueda e colaboradores (2013) relatam que estudos prévios demonstraram que ao contrário do observado para *hns*, a inativação de *stpA* não está associada a nenhum fenótipo notável sob condições de crescimento padrão em *E. coli*, provavelmente porque sua função é compensada por H-NS. Por outro lado, sugere-se que StpA é capaz de compensar parcialmente a inativação de *hns* (SHI e BENNETT, 1994; WILLIAMS *et al.*, 1996; DEIGHAN *et al.*, 2000). Em mutantes Δhns de *E. coli*, foi observado que a transcrição de *stpA* aumenta, e no duplo mutante *hns/stpA* houve uma diminuição da taxa de crescimento das bactérias em comparação com o mutante simples Δhns (SONDEN e UHLIN, 1996; ZHANG *et al.*, 1996), o que nos mostra que StpA tem papel importante na fisiologia bacteriana, principalmente na ausência de H-NS. Porém, como não foram observadas diferenças consideráveis entre as linhagens parentais e mutantes $\Delta stpA$ nas curvas de crescimento, podemos considerar que StpA não é essencial para o crescimento bacteriano.

A inativação do gene *hns* tem efeitos sobre a expressão de vários genes, tanto em *E. coli* quanto em *S. enterica* (UEDA *et al.*, 2013). Em células com *hns* deletado, a ligação de StpA ao DNA é reduzida a um terço, já a ligação de H-NS ao DNA não é afetada pela inativação de *stpA* (UYAR *et al.*, 2009). Mutações em *hns* são altamente pleiotrópicas, enquanto que exemplos de genes que são regulados apenas por StpA são raros (DORMAN, 2004; UYAR *et al.*, 2009).

Especulávamos que a deleção de *stpA* poderia afetar a curva de crescimento das linhagens mutantes, pois a nível de expressão gênica, ao contrário do que ocorre em *E. coli*, StpA regula

um grande número de genes em *S. enterica* Typhimurium. Lucchini e colaboradores (2009) realizaram trabalho onde avaliaram o impacto da deleção de *stpA* sobre a expressão gênica global de *S. enterica* Typhimurium em diferentes fases de crescimento e foi observado que StpA desempenha um papel importante na regulação gênica em fases específicas de crescimento. Durante a fase exponencial mediana, StpA impede a expressão do *regulon* σ^{38} enquanto que, durante a fase exponencial tardia, StpA é necessária para a expressão do *regulon* CRP-cAMP. Mesmo com essas observações, a nível fenotípico não visualizamos diferenças na taxa ou períodos de crescimento dos mutantes Δ *stpA* em comparação com as linhagens parentais.

Observando os dados de sobrevivência sob estresse nutricional e em meio com adição de sais biliares, embora o experimento sob estresse nutricional tenha sido realizado apenas com a linhagem 662STm e mutantes, observou-se que tanto as linhagens selvagens quanto mutantes apresentaram comportamento semelhante quanto ao número de UFC/mL da cultura ao longo do tempo, demonstrando que os mutantes Δ *stpA* e Δ *ybaB* são capazes de sobreviver a tais condições ambientais da mesma forma que as linhagens selvagens.

StpA é expressa em níveis baixos em bactérias crescendo em meio de cultura complexos, mas tais níveis aumentam durante o crescimento em meio mínimo e quando a bactéria encontra-se em condições de estresse (SONDEN e UHLIN, 1996; FREE e DORMAN, 1997; DORMAN, 2004). No presente estudo, foi avaliado o crescimento de mutantes de *S. enterica* Δ *stpA* em meio mínimo porém em fase estacionária. Como foi descrito em trabalhos anteriores, StpA é repressora do *regulon* RpoS durante a fase exponencial de crescimento (LUCCHINI *et al.*, 2009) e sendo assim, é possível que estudos avaliando nossos mutantes Δ *stpA* inoculados em meio mínimo e realizando-se contagem de UFC/mL em fase exponencial de crescimento possam apresentar

alterações nas taxas de sobreviventes das linhagens mutantes em relação às linhagens parentais correspondentes.

Também foram realizados outros experimentos para caracterização fenotípica dos mutantes sob diferentes condições ambientais: sobrevivência em pH ácido, em meio com peróxido de hidrogênio e também resistência a elevada concentração salina. Porém, os resultados desses experimentos são preliminares, já que precisam ser ainda repetidos para confirmação do fenótipo. De modo geral, sob pH ácido os mutantes 662STm $\Delta ybaB$ e 662STm $\Delta stpA$ aparentemente são mais sensíveis, já com relação à sobrevivência sob concentração salina elevada e em meio com peróxido de hidrogênio, mutantes $\Delta stpA$ mostraram-se mais resistentes a essas condições de estresse do que a linhagem parental, enquanto $\Delta ybaB$ mostrou-se mais sensível.

Lucchini e colaboradores (2009) também observaram que mutantes $\Delta stpA$ de *S. enterica* mostraram-se mais resistentes a uma série de estresses na fase exponencial mediana (*mid-exponential phase* (MEP)), como a elevada concentração de sal, em meio com peróxido de hidrogênio e também sob pH ácido (pH = 3,0). Tais resultados foram também observados mediante a superexpressão de StpA, o que aumentou a sensibilidade das células a NaCl e peróxido de hidrogênio, em comparação com a linhagem parental. Embora nossos experimentos de estresse ambiental ainda tenham que ser repetidos, de modo geral, as características fenotípicas observadas para mutantes $\Delta stpA$ de *S. enterica* no presente estudo, corroboram com os resultados de Lucchini *et al.* (2009). Tais autores ainda apontam que mais de um terço dos genes que estão sob regulação de StpA e deixam de ser reprimidos no mutante $\Delta stpA$ durante a fase MEP são ativados pelo fator σ^{38} em *S. enterica*. O fator σ^{38} é codificado por *rpoS* e é necessário

durante o processo de reprogramação celular associado com a entrada da célula em fase estacionária ou em condições adversas de crescimento (ISHIHAMA, 2000). A transcrição de um grande número de genes associados à fase estacionária é ativada por σ^{38} e confere maior resistência a uma série de estresses físicos e químicos, como acidez, altas temperaturas e agentes oxidantes (KLAUCK *et al.*, 2007). A lista de genes regulados por σ^{38} que deixam de ser reprimidos no mutante $\Delta stpA$ inclui genes envolvidos na resistência ao choque osmótico (*otsAB*) e estresse oxidativo (*katN* e *katE*) (LUCCHINI *et al.*, 2009).

Dados da literatura também corroboram nossos resultados obtidos no ensaio de motilidade para mutantes $\Delta stpA$. Os valores de motilidade observados entre a linhagem selvagem 607STi e o mutante 607STi $\Delta stpA::cat$ foram próximos, não apresentando diferença estatística significativa. Já se sabe que em *E. coli*, H-NS ativa a transcrição de genes flagelares e atua diretamente na modulação do funcionamento do motor flagelar. H-NS é conhecida por se ligar a FliG, uma proteína que está diretamente envolvida na rotação flagelar. StpA também se liga a FliG e age de forma similar a H-NS, embora menos eficientemente. Foi observado que o mutante $\Delta stpA$ exibiu motilidade muito próxima ao da linhagem parental, indicando que H-NS é mais importante que StpA para o funcionamento flagelar (PAUL *et al.*, 2011). Em *S. enterica*, Lucchini e colaboradores (2009) relatam que StpA não regula o sistema relacionado à motilidade, embora esse mesmo sistema seja fortemente regulado por H-NS.

Ainda com relação ao ensaio de motilidade, mutantes $\Delta ybaB$ de *S. enterica* demonstraram menor motilidade nas duas linhagens estudadas, sendo que na maioria dos experimentos, a diferença na motilidade do mutante com relação ao selvagem foi estatisticamente significativa. Tais resultados lançam perspectivas para estudos futuros, visando a compreensão da função de

YbaB na motilidade. Estudos mais aprofundados e o uso de técnicas adicionais, como a realização de *Real Time* - PCR para genes relacionados com a cascata de expressão flagelar de *S. enterica* poderão auxiliar o entendimento do papel biológico dessa proteína na motilidade. Estudos de transcriptoma e proteômica também poderão trazer dados importantes quanto a função de YbaB em *S. enterica* e outras enterobactérias.

É possível observar que a mutação de *ybaB* também não alterou de forma significativa o crescimento quando comparado a linhagem parental. A função de YbaB é ainda pouco conhecida (COOLEY *et al.*, 2009), sobretudo em *S. enterica*. Não há sequer mutantes descritos na literatura para este gene em *S. enterica*. Assim, ainda que alguns de nossos resultados sejam preliminares, nossas observações sobre a deleção desse gene em *S. enterica* contribui para o avanço da compreensão da função de YbaB.

Em *Borrelia burgdorferi*, bactéria responsável pela doença de Lyme, foi observado que a transcrição de *ebfC* ocorre em níveis significativamente maiores durante a infecção de mamíferos pela bactéria presente no intestino de carrapatos não alimentados (MEDRANO *et al.*, 2007). Jutras e colaboradores (2012) demonstraram em seu trabalho que *ebfC* é transcrito em altos níveis na fase exponencial de crescimento e que transcritos não são detectados na fase estacionária. Os autores ainda relatam que várias tentativas de deleção de *ebfC* realizadas pelo seu grupo e também por outros, não foram bem sucedidas, sugerindo que o produto gênico de *ebfC* é essencial para *B. burgdorferi*. Como método alternativo para análise dos efeitos de EbfC sobre a expressão gênica dessa bactéria, os autores super expressaram EbfC. Tal procedimento não provocou efeitos mensuráveis sobre a taxa de crescimento de *B. burgdorferi*.

Foi observado que quando sob níveis aumentados de EbfC, *B. burgdorferi* apresentou alterações estatisticamente significantes nos níveis de expressão de 52 genes, sendo que alguns

desses foram positivamente influenciados por EbfC enquanto outros foram reprimidos. Um dos quatro genes afetados positivamente por níveis maiores de EbfC, foi *dbpB*, que codifica uma proteína de membrana envolvida com a aderência da bactéria aos tecidos do hospedeiro mamífero durante o processo de infecção. Um importante gene reprimido por EbfC, observado pelos autores, foi *flhB*, o qual codifica uma proteína de montagem/exportação flagelar (JUTRAS *et al.*, 2012). Embora este resultado tenha sido observado em *B. burgdorferi*, tal dado corrobora nossas observações sobre as alterações da motilidade verificadas em mutantes *ΔybaB* de *S. enterica*. No entanto, são necessários estudos adicionais para se determinar o papel de *ybaB* na motilidade de *S. enterica*.

Outras importantes considerações a respeito de *ybaB* dizem respeito à sua localização no genoma de *S. enterica*. O gene *ybaB* localiza-se logo após o gene *dnaX* e precede *recR*. *dnaX* codifica uma subunidade da DNA polimerase III, enquanto *recR* codifica uma proteína de recombinação/reparo do DNA. Em muitas bactérias os ortólogos *ybaB/ebfC* estão localizados entre *dnaX* e *recR*, o que levou a sugestões sobre o papel de YbaB/EbfC na replicação do DNA ou no processo de recombinação. Há estudo que relata que *ybaB* é co-expresso com *recR* em *Haemophilus influenzae* (LIM *et al.*, 2003) e há também um estudo que sugere que *dnaX* é co-transcrito com *ebfC* em *B. burgdorferi* (JUTRAS *et al.*, 2012). Também existe evidência de que as proteínas YbaB/EbfC executam funções que são independentes dos processos de replicação ou recombinação do DNA (COOLEY *et al.*, 2009). Análises proteômicas de *H. influenzae* detectaram YbaB sem a produção concomitante de proteínas de reparo do DNA (KOLKER *et al.*, 2003) e o duplo mutante *ybaB/recR* exibiu falhas no processo de recombinação em *Streptomyces coelicolor* que foram complementadas apenas com *recR* (PELAEZ *et al.*, 2001). Em algumas espécies de bactérias, *ybaB/ebfC* não precede *recR* ou qualquer outro gene relacionado com

processos de recombinação, como *B. burgdorferi*, que nem codifica RecR (FRASER *et al.*, 1997; BABB *et al.*, 2006). Já *H. influenzae* não apresenta *ybaB* localizado logo após o gene *dnaX* (FLEISCHMANN *et al.*, 1995). Assim, uma análise detalhada sobre a expressão de *ybaB* e genes adjacentes em *S. enterica* poderá auxiliar o entendimento da influência de *ybaB* sobre a transcrição de outros genes e sobre a própria regulação de *ybaB*.

Estudos com infecção oral em modelo murino têm permitido a investigação de fatores de virulência relacionados com o quadro de doença sistêmica semelhante ao da febre tifóide. Estudos *in vitro* e *in vivo* fornecem dados importantes sobre os fatores de virulência relacionados à salmonelose (WALLIS e GALYOV, 2000; JONES, 2005). No presente trabalho, foram utilizados camundongos BALB/c/AnUnib para avaliação do fenótipo de virulência dos mutantes. BALB/c é considerado modelo murino para infecção sistêmica por *S. enterica* (MASTROENI e MASKELL, 2006).

Para avaliar a virulência das linhagens 662STm $\Delta ybaB$, 662STm $\Delta stpA$ e 607STi $\Delta ybaB$ *in vivo* foi determinada a DL₅₀ de cada uma das linhagens e esta comparada a DL₅₀ das linhagens parentais. Para os três mutantes analisados, não foram observadas alterações substanciais na DL₅₀, o que descarta a possibilidade de que tais linhagens sejam utilizadas como linhagens vacinais vivas atenuadas. No entanto, não é possível concluir que tais genes não afetam a patogenicidade, uma vez que o modelo murino de infecção sistêmica tem algumas limitações. Assim, avaliações futuras serão necessárias, como por exemplo, a utilização de modelos que avaliam a indução de gastroenterite.

Embora as linhagens mutantes construídas não apresentem potencial biotecnológico para produção de vacinas, nosso trabalho é o primeiro a observar o fenótipo de virulência dos mutantes $\Delta stpA$ e $\Delta ybaB$ em *S. enterica* no modelo murino de infecção sistêmica, além de

apresentar dados de caracterização fenotípica dessas linhagens. Há a necessidade de estudos que tornem mais clara nossa compreensão do papel de StpA e sobretudo de YbaB em *S. enterica*. Assim, o presente estudo é apenas parte de um importante trabalho de investigação da função dessas proteínas na fisiologia de *S. enterica*.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram que as mutações $\Delta stpA$ e $\Delta ybaB$ não afetaram a taxa de crescimento de *S. enterica* e que de modo geral, resultados preliminares demonstraram que as linhagens com a mutação $\Delta stpA$ quando comparadas com as linhagens parentais correspondentes mostraram-se mais resistentes a certas situações de estresse, enquanto que as linhagens com mutação $\Delta ybaB$ foram mais sensíveis. Também podemos sugerir que a mutação $\Delta ybaB$ afetou de modo significativo a motilidade de *S. enterica*, diminuindo-a nas duas linhagens estudadas, enquanto que linhagens $\Delta stpA$ não apresentaram diminuição significativa na motilidade.

Com relação à caracterização dos mutantes *in vivo*, as linhagens obtidas no trabalho não apresentaram níveis significativos de atenuação da virulência, descartando a possibilidade de uso de tais linhagens como vacinas contra *S. enterica*. Nosso trabalho foi o primeiro a construir mutantes $\Delta ybaB$ em *S. enterica* e ainda a observar a virulência de $\Delta stpA$ e $\Delta ybaB$ em modelo murino de infecção. Nossos resultados abrem perspectivas para trabalhos futuros, principalmente com relação ao gene *ybaB*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M. *et al.* International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 726-31, 2007.
- ALI AZAM, T. *et al.* Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6361-70, 1999.
- ALLAM, U. S. *et al.* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking hfq gene confers protective immunity against murine typhoid. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16667, 2011.
- ALPUCHE-ARANDA, C.M. *et al.* *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 601-8, 1994.
- ANSARI, S. *et al.* Bacterial etiology of acute diarrhea in children under five years of age. **Journal of Nepal Health Research Council**, v. 10, n. 22, p. 218-23, 2012.
- AZAM, T. A.; ISHIHAMA, A. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 33105-13, 1999.
- BABB, K. *et al.* *Borrelia burgdorferi* EbfC, a novel, chromosomally encoded protein, binds specific DNA sequences adjacent to erp loci on the spirochete's resident cp32 prophages. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 12, p. 4331-9, Jun 2006.
- BABIUK, L. A. Broadening the approaches to developing more effective vaccines. **Vaccine**, v. 17, n. 13-14, p. 1587-95, 1999.
- BERN, C. *et al.* The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bulletin World Health Organization**, v. 70, n. 6, p. 705-14, 1992.
- BLANC-POTARD, A. B. *et al.* The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 998-1004, 1999.
- CHAUDHURI, R. R. *et al.* Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 4, p. e1003456, 2013.
- CLARK, G. M. *et al.* Epidemiology of an International Outbreak of *Salmonella* Agona. **Lancet**, v. 2, n. 7827, p. 490-493, 1973.
- COOLEY, A. E. *et al.* DNA-binding by *Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli* YbaB, members of a widely-distributed bacterial protein family. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 137, 2009.
- COURT, D. L.; SAWITZKE, J. A.; THOMASON, L. C. Genetic engineering using homologous recombination. **Annual Review Genetics**, v. 36, p. 361-88, 2002.
- CRUMP, J. A.; GRIFFIN, P. M.; ANGULO, F. J. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 7, p. 859-65, 2002.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 405-28, Jul 1999.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6640-5, 2000.

DE JONG *et al.* Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 10, p. e1002933, 2012.

DEIGHAN, P.; FREE, A.; DORMAN, C. J. A role for the *Escherichia coli* H-NS-like protein StpA in OmpF porin expression through modulation of micF RNA stability. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 126-39, 2000.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 1-2, p. 99-109, 1997.

DILLON, S. C.; DORMAN, C. J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 185-95, 2010.

DORMAN, C.J. DNA supercoiling and the environmental regulation of virulence gene expression in bacterial pathogens. **Infection and Immunity**, 59: 745–749, 1991.

DORMAN, C. J. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 391-400, 2004.

DORMAN, C.J. DNA supercoiling and bacterial gene expression. **Science Progress**, v. 89, p. 151–166, 2006.

DORMAN, C. J. Global regulators and environmental adaptation in Gram-negative pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15 Suppl 1, p. 47-50, 2009.

DORMAN, C. J.; DEIGHAN, P. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 13, n. 2, p. 179-84, 2003.

DRLICA, K.; ROUVIERE-YANIV, J. Histone like proteins of bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 51, n. 3, p. 301-19, 1987.

ETHELBERG, S. *et al.* *Salmonella* and *Campylobacter* infections in 2008. **Ugeskr Laeger**, v. 172, n. 19, p. 1451-5, 2010.

FABREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308-41, 2013.

FERNANDES, S. A. *et al.* *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. 179-84, 2006.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. **Biochimie**, v. 70, p. 1089–1099, 1988.

FINLAY, B.B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 99, p. 283–296, 1991.

FLEISCHMANN, R. D. *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 1995.

FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 5129–513, 1991.

FRANCIS, C.L.; STARNBACH, M.N.; FALKOW, S. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella* typhimurium grown under low-oxygen conditions. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 3077–3087, 1992.

FRANCIS, C.L.; RYAN, T.A.; JONES, B.D.; SMITH, S.J.; FALKOW, S. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. **Nature**, v. 364, p. 639–642, 1993.

FRASER, C. M. *et al.* Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 580–6, 1997.

FREE, A.; DORMAN, C. J. The *Escherichia coli* *stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 3, p. 909–18, 1997.

GALEN, J. E.; CURTISS, R., 3RD. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. **Vaccine**, Dec 23 2013.

GARCIA-DEL PORTILLO, F.; FINLAY, B.B. *Salmonella* invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 4641–4645, 1994.

GAST, R. K.; BENSON, S. T. The comparative virulence for chicks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found in poultry in the United States. **Avian Diseases**, v. 39, n. 3, p. 567–74, 1995.

GORDON, M. A. *et al.* Epidemics of invasive *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *S. enterica* serovar Typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 7, p. 963–9, 2008.

GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 22–6, 2008.

GROISMAN, E. A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1835–42, 2001.

HALD, T. *et al.* A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. **Risk Analysis**, v. 24, n. 1, p. 255–69, 2004.

HENDRIKSEN, R. S. *et al.* Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Salmonella* Rissen from animals, food products, and patients in Thailand and Denmark. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 5, n. 5, p. 605–19, 2008.

HENDRIKSEN, R. S. *et al.* Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 8, n. 8, p. 887-900, 2011.

HERNANDEZ, S. B. *et al.* Adaptation and preadaptation of *Salmonella enterica* to Bile. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 1, p. e1002459, 2012.

HEYNDRIKX, M. *et al.* Routes for salmonella contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. **Epidemiology and Infection**, v. 129, n. 2, p. 253-65, 2002.

HOBBIE, S.; CHEN, L.M.; DAVIS, R.J.; GALAN, J.E. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 159, p. 5550–5559, 1997.

ISHIHAMA, A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 499-518, 2000.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. In: Ed. Maryland: Aspen Publishers Inc., Modern Food Microbiology, p.511-525, 2000.

JOHANSSON, J.; UHLIN, B.E. Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 10776–10781, 1999.

JONES, B.D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 15–23, 1994.

JONES, B. D. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. **Journal of Microbiology**, v. 43 Spec No, p. 110-7, 2005.

JONES, T. F. *et al.* Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 1, p. 109-14, 2008.

JUTRAS, B. L. *et al.* EbfC (YbaB) is a new type of bacterial nucleoid-associated protein and a global regulator of gene expression in the Lyme disease spirochete. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 13, p. 3395-406, 2012.

KABIR, M. R. *et al.* Enteropathogens associated with acute diarrhea in a tertiary hospital of Bangladesh. **Mymensingh Medical Journal**, v. 21, n. 4, p. 618-23, 2012.

KARIUKI, S. *et al.* Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 101, 2006.

KHAN, S. A. *et al.* *Salmonella Typhi* and *S Typhimurium* derivatives harbouring deletions in aromatic biosynthesis and *Salmonella* Pathogenicity Island-2 (SPI-2) genes as vaccines and vectors. **Vaccine**, v. 21, n. 5-6, p. 538-48, 2003.

KISS, J.; NAGY, B.; OLASZ, F. Stability, entrapment and variant formation of *Salmonella* genomic island 1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e32497, 2012.

KLAUCK, E.; TYPAS, A.; HENGGE, R. The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. **Science Progress**, v. 90, n. Pt 2-3, p. 103-27, 2007.

KOLKER, E. *et al.* Initial proteome analysis of model microorganism *Haemophilus influenzae* strain Rd KW20. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 15, p. 4593-602, 2003.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bulletin of World Health Organization**, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2003.

KOZAK, G. K. *et al.* Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 1, p. 173-83, 2013.

LEE, S. J. *et al.* Identification of a common immune signature in murine and human systemic Salmonellosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 13, p. 4998-5003, 2012.

LEONARD, P.G., ONO, S., GOR, J., PERKINS, S.J., AND LADBURY, J.E. Investigation of the self association and hetero association interactions of H-NS and StpA from Enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 73, p. 165–179, 2009.

LIM, C. J. *et al.* Gene silencing H-NS paralogue StpA forms a rigid protein filament along DNA that blocks DNA accessibility. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 8, p. 3316-28, 2012.

LIM, K. *et al.* Crystal structure of YbaB from *Haemophilus influenzae* (HI0442), a protein of unknown function coexpressed with the recombinational DNA repair protein RecR. **Proteins**, v. 50, n. 2, p. 375-9, 2003.

LUCCHINI, S. *et al.* The H-NS-like protein StpA represses the RpoS (sigma 38) regulon during exponential growth of *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1169-86, 2009.

LUIJSTERBURG, M. S. *et al.* The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. **Journal of Structural Biology**, v. 156, n. 2, p. 262-72, 2006.

MACLENNAN, C. A. *et al.* Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal *Salmonella* in HIV-infected African adults. **Science**, v. 328, n. 5977, p. 508-12, 2010.

MAJOWICZ, S. E. *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882-9, 2010.

MALOY, S.R.; STEWART, V.J.; TAYLOR, R.K. **Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

MARTIN, L. B. Vaccines for typhoid fever and other salmonellosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 489-99, 2012.

MASTROENI, P.; MASKELL, D. **Salmonella infections: Clinical, immunological and molecular aspects**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 381 p., 2006.

MATSUBARA, K. *et al.* Structural and Functional Characterization of the Red beta Recombinase from Bacteriophage lambda. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e78869, 2013.

MCCLELLAND, M. *et al.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 852-6, 2001.

MCLEOD, S. M.; JOHNSON, R. C. Control of transcription by nucleoid proteins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 152-9, 2001.

MEDEIROS, M.A.N.; OLIVEIRA, D.C.N.; RODRIGUES, D.P.; FREITAS, D.R.C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 30 (6), 2011.

MEDRANO, M. S. *et al.* Regulators of expression of the oligopeptide permease A proteins of *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 7, p. 2653-9, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar; 2008. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf. Acessado em 06 de maio de 2013.

MURPHY, K. C. Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 18, p. 5808-21, 1991.

MURPHY, K. C. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 8, p. 2063-71, 1998.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 259-274, 2001.

PAIAO, F. G. *et al.* Detection of *Salmonella* spp, *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 37-41, 2013.

PAUL, K.; CARLQUIST, W. C.; BLAIR, D. F. Adjusting the spokes of the flagellar motor with the DNA-binding protein H-NS. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 21, p. 5914-22, 2011.

PELAEZ, A. I. *et al.* Structural and functional characterization of the *recR* gene of *Streptomyces*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 265, n. 4, p. 663-72, 2001.

POTEETE, A. R. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 1, p. 9-14, 2001.

PREJIT *et al.* Evaluation of recombinant outer membrane protein based vaccine against *Salmonella* Typhimurium in birds. **Biologicals**, v. 41, n. 3, p. 162-8, 2013.

RASSCHAERT, G. *et al.* Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p. 146-52, 2008.

- RILEY, S. P. *et al.* *Borrelia burgdorferi* EbfC defines a newly-identified, widespread family of bacterial DNA-binding proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. 1973-83, 2009.
- ROBINOW, C.; KELLENBERGER, E. The bacterial nucleoid revisited. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 2, p. 211-32, 1994.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2444p., 2001.
- SCHROEDER, N.; MOTA, L. J.; MÉRESSE, S. *Salmonella* – induced tubular networks. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 268-77, 2011.
- SHARAN, S. K. *et al.* Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. **Nature Protocols**, v. 4, n. 2, p. 206-23, 2009.
- SHI, X.; BENNETT, G. N. Plasmids bearing *hfq* and the *hns*-like gene *stpA* complement *hns* mutants in modulating arginine decarboxylase gene expression in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 21, p. 6769-75, 1994.
- SHIPPY, D. C. *et al.* Virulence characteristics of *Salmonella* following deletion of genes encoding the tRNA modification enzymes GidA and MnmE. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 1-9, 2013.
- SINGH, A.K. *et al.* Laser optical sensor, a label-free on-plate *Salmonella enterica* colony detection tool. **mBio**, v. 5, n. 1, e01019-13, 2014.
- SONDEN, B.; UHLIN, B. E. Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. **EMBO Journal**, v. 15, n. 18, p. 4970-80, 1996.
- SONG, J. *et al.* Construction and functional characterization of an integrative form lambda Red recombineering *Escherichia coli* strain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 2, p. 178-83, 2010.
- SONNENFIELD, J. M. *et al.* The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutants. **Biochimie**, v. 83, n. 2, p. 243-9, 2001.
- STEVENS, M. P.; HUMPHREY, T. J.; MASKELL, D. J. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2709-23, 2009.
- SUEZ, J. *et al.* Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58449, 2013.
- TAKEUCHI, A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. **The American Journal of Pathology**, v. 50, p. 109-136, 1967.
- THANBICHLER, M.; WANG, S. C.; SHAPIRO, L. The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, n. 3, p. 506-21, 2005.

UEDA, T. *et al.* Functions of the Hha and YdgT proteins in transcriptional silencing by the nucleoid proteins, H-NS and StpA, in *Escherichia coli*. **DNA Research**, v. 20, n. 3, p. 263-71, 2013.

UYAR, E. *et al.* Differential binding profiles of StpA in wild-type and *h-ns* mutant cells: a comparative analysis of cooperative partners by chromatin immunoprecipitation-microarray analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2388-91, 2009.

VAN IMMERSEEL, F. *et al.* Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, v. 83, n. 11, p. 1911-6, 2004.

VAZQUEZ-TORRES, A. *et al.* *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. **Science**, v. 287, p. 1655-8, 2000.

VOJDANI, J. D.; BEUCHAT, L. R.; TAUXE, R. V. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 2, p. 356-64, 2008.

YAMAMOTO, S.; KUTSUKAKE, K. FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 958-967, 2006.

YANG, Y. *et al.* Identification of an outer membrane protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a potential vaccine candidate for Salmonellosis in mice. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 5, p. 388-98, 2013.

YU, H. *et al.* Chemo-mechanical joint detection with both dynamic and static microcantilevers for interhomologue molecular identification. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6679-85, 2012.

WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 997-1005, 2000.

WELKOS, S.; O'BRIEN, A. Determination of median lethal and infectious doses in animal model systems. **Methods of Enzymology**. 235: 29-39, 1994.

WILLIAMS, R. M.; RIMSKY, S.; BUC, H. Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 15, p. 4335-43, 1996.

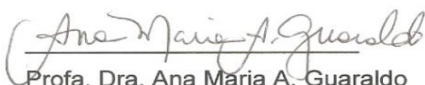
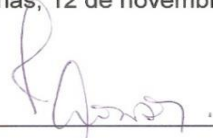
ZHANG, A. *et al.* *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. **EMBO Journal**, v. 15, n. 6, p. 1340-9, 1996.

ZHANG, Y. *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p. 123-8, Oct 1998.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1

Certificados de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais - Unicamp

 UNICAMP	 CEUA/Unicamp
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp	
CERTIFICADO	
Certificamos que o projeto "<u>Construção de linhagens mutantes de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium para genes codificadores de proteínas ligantes de DNA: avaliação de características fenotípicas</u>" (protocolo nº <u>2899-1</u>), sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Marcelo Brocchi / Tamires Fernanda Vilas Boas Cordeiro</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.	
O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em <u>12 de novembro de 2012</u>.	
 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	Campinas, 12 de novembro de 2012.  Fátima Alonso Secretária Executiva
CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Construção de linhagens mutantes de *Salmonella enterica Typhimurium* para genes codificadores de proteínas ligantes de DNA: avaliação de características fenotípicas" (protocolo nº 3125-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Brocchi / Tamires Fernanda Vilas Boas Cordeiro, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 20 de agosto de 2013.

Campinas, 20 de agosto de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "Construção de linhagens mutantes de *Salmonella enterica* Typhimurium para genes codificadores de proteínas ligantes de DNA: avaliação de características fenotípicas":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

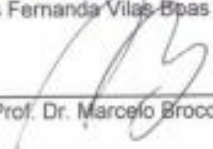
() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

(x) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , protocolos No. 2899-1 e 3125-1, Instituição: IB - UNICAMP

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Tamires Fernanda Vilas Boas Cordeiro


Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

9.2. Anexo 2

Preparo de Solução e Meio de Cultura

Preparo de solução 50x E Salts (Vogel-Bonner *Minimal Salts*)

Para o preparo de 1 L:

670 mL de água deionizada

10 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 g de ácido cítrico. H_2O

500 g de K_2HPO_4

175 g de $\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Dissolver os sais, em ordem a 45°C. Ajustar o volume com água deionizada para 1 L.

Manter à temperatura ambiente.

Preparo de placas com meio de cultura *Mint Green*

Para o preparo de 1 L de meio *Mint Green*:

Frasco A

10 g de triptona

5 g de extrato de levedura

5 g de cloreto de sódio (NaCl)

2,5 g de glicose

15 g de ágar

500 mL de água

Frasco B

0,5 g de fosfato de potássio dibásico tri-hidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)

500 mL de água

Os dois frascos devem ser autoclavados a 121°C. Após o resfriamento das soluções, adicionar o conteúdo do frasco B no frasco A. Em seguida, adicionar ao meio de cultura os seguintes corantes:

- ✓ 1,25 mL de solução estoque de *Evans Blue*
- ✓ 2,5 mL de solução estoque de *Uranine*

Solução estoque dos corantes:

Evans Blue: 1% (peso : volume) em água

Uranine: 1% (peso : volume) em água

Autoclavar e manter as soluções protegidas de luz.