UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

LUCIANE BENEDITA DUARTE PIVETTA

Construção e Caracterização de Linhagens Atenuadas de *Salmonella enterica*: Avaliação do Potencial Imunogênico e Protetor

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Luciane B. Duarte Pivetta
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Campinas-SP, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P688c

Pivetta, Luciane Benedita Duarte
Construção e caracterização de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica*: avaliação do potencial imunogênico e protetor / Luciane Benedita Duarte Pivetta. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

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

1. *Salmonella enterica*. 2. Vacina. 3. Atenuação. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Development and characterization of live attenuated *Salmonella enterica* vaccine strains: evaluation of the immunogenicity and the protective potential.
Palavras-chave em inglês: *Salmonella enterica*; Vaccine; Attenuation.
Área de concentração: Bioquímica.
Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.
Banca examinadora: Marcelo Brocchi, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Maria Sbrogio de Almeida.
Data da defesa: 28/02/2011.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 28 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador) _____
Assinatura

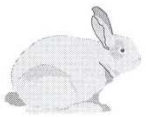
Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira _____
Assinatura

Profa. Dra. Maria Elisabete Sbrogio de Almeida _____
Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck _____
Assinatura

Prof. Dr. Gerson Nakazato _____
Assinatura

UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1933-1**, sobre **"Construção e caracterização de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* Typhimurium: avaliação do potencial imunogênico e protetor"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Brocchi / Luciane Benedita Duarte Pivetta**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **31 de agosto de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1933-1**, entitled **"Development and characterization of attenuated *Salmonella enterica* strains: evaluation of the immunogenicity and protective potential"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **August 31, 2009**.

Campinas, 31 de agosto de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

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

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana, situado no Instituto de Biologia da Unicamp e contou com o apoio financeiro das agências de fomento FAPESP e Capes.

Agradecimentos

A Deus, pela dádiva da vida.

Aos meus pais Ayrdes e Darci, à minha irmã Luize e à minha avó Antonina, pelo amor e confiança, assim como aos demais familiares.

Ao meu namorado Tarcio, pelo carinho e companheirismo. Aos meus sogros, Mariza e João, por serem como uma segunda família em Campinas.

Ao meu orientador Marcelo Brocchi, pela dedicação, ensinamentos e confiança.

Aos amigos e amigas, que mesmo longe torceram pelo meu sucesso.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Gustavo (Dã...) pelos conhecimentos passados e ao Igor pela amizade.

Ao apoio técnico fornecido pelo Evandro.

Aos laboratórios do IB que abriram suas portas para a realização de experimentos.

Ao Cemib, pelo fornecimento de animais e a Érika, por sua simpatia em atender-me.

Aos animais utilizados neste trabalho, essenciais para os resultados obtidos.

À Faepex/Funcamp, pela ajuda financeira que em parte permitiu minha participação no congresso em Villars-sur-Ollon, Suíça.

À Fapesp e à CAPES, pelas bolsas de Mestrado concedidas.

À Unicamp e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, que me proporcionaram o privilégio de estudar nessa Universidade.

"Duvidar de tudo ou crer em tudo.
São duas soluções igualmente cômodas,
que nos dispensam, ambas, de refletir."

Henri Poincaré,
matemático e filósofo francês (1854-1912).

RESUMO

Sorovariedades patogênicas de *Salmonella enterica* constituem um problema de saúde global, que abrange desde gastroenterites até doenças sistêmicas, sendo que ambas podem ser letais. Linhagens atenuadas de *S. enterica* são promissoras como vacinas vivas, pois são facilmente administradas via oral e capazes de induzir o sistema imune sistêmico e de mucosas do hospedeiro. Além disso, apresentam o potencial de atuar como vacinas multifatoriais, expressando antígenos de outros agentes infecciosos. Neste trabalho, linhagens recombinantes de *Salmonella enterica* foram construídas e a atenuação da virulência e a estimulação do sistema imune foram avaliadas no modelo murino da salmonelose. As linhagens recombinantes foram desenvolvidas a partir do sistema de recombinação homóloga λRed, com a deleção de um ou mais genes com efeitos pleiotrópicos na virulência de *Salmonella*. Após a confirmação da deleção do gene alvo por PCR, as linhagens foram transduzidas com o bacteriófago P22, visando eliminar possíveis problemas com a integridade de lipopolissacarídeos. Posteriormente, caracterizações fenotípicas foram realizadas, por meio de curvas de crescimento *in vitro*, verificação da capacidade de invasão e sobrevivência no interior de macrófagos e resistência a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A atenuação da virulência das linhagens foi avaliada *in vivo* por meio de inoculações orais e intraperitoneais em camundongos BALB/c/AnUnib e a dose letal média também foi estabelecida. Variados níveis de atenuação foram atingidos e dentre as linhagens desenvolvidas, a duplo mutante para os genes *hupA* e *hupB* foi a que apresentou os resultados mais promissores. Nos ensaios de proteção e desafio, 100% dos animais vacinados com duas doses da linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* sobreviveram ao desafio com doses letais da linhagem selvagem. Para a linhagem duplo mutante também foi verificada a capacidade de colonização bacteriana no sangue, placas de Peyer e baço, assim como a produção de anticorpos IgG e IgA. A obtenção de uma linhagem atenuada, porém capaz de induzir com eficácia o sistema imune do hospedeiro é idealmente almejada no desenvolvimento de uma vacina viva. No entanto, atingir esse balanço é um desafio, já que a deleção de genes de virulência de *Salmonella* acarreta em diferentes níveis de atenuação, mesmo quando os genes são intimamente relacionados. Uma perspectiva futura é o refinamento das linhagens atenuadas por meio da introdução de antígenos heterólogos e de um sistema de expressão regulado, com o estabelecimento de vacinas multifatoriais.

ABSTRACT

Pathogenic *Salmonella enterica* serovars are the cause of a global health problem that ranges gastroenteritis to lethal systemic disease. Attenuated strains of *Salmonella enterica* are promising as live vaccines because they are orally administrated and capable of inducing a mucosal and systemic immune response in the host. Besides, they can act as multifactorial vaccines delivering antigens from other diseases. In this work, attenuated strains of *Salmonella enterica* were produced and the attenuation of the virulence and the induction of an immunologic response were evaluated in the murine model of salmonellosis. The recombinant strains were constructed using the λRed system of homologous recombination deleting one or more genes with pleiotropic effects on *Salmonella* virulence. After that, a PCR to confirm the deletion of the target gene was made and the strains were transduced with bacteriophage P22 to avoid problems with lipopolysaccharide's integrity. Phenotypic characterization as the *in vitro* growth curve of the strains, the resistance to ROI and RNI species and the ability of survival inside J774 macrophages cultures were performed. The attenuation of the strains was evaluated *in vivo* trough oral and intraperitoneal inoculations of the strains into BALB/c/AnUnib mice and the median lethal dose was also established. Many levels of attenuation were reached and among the developed strains, the double mutant strain for the genes *hupA* and *hupB* was the one with the best results. In the protection and challenge assays, 100% of the animal vaccinated with two doses of the Δ*hupA*Δ*hupB* strain survived to the challenge with lethal doses of the wild type strain. For this strain it was also verified the capacity of colonization into blood, peyer's patches and spleen as well as the production of IgG and IgA antibodies. In the developmente of a live vaccine it is ideal to have a strain that is attenuated but still capable of inducing an immune response in the host. Reaching this balance is a challenge and the deletion of virulence genes in *Salmonella* entails different levels of attenuation although they are closely related. A future prospect is the improvement of these attenuated strains with the insertion of controlled expression systems and heterologous antigens, creating a multifactorial vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPc	ADENOSINA 3',5' MONOFOSFATO CÍCLICO
ASN	NITRITO DE SÓDIO EM MEIO ACIDIFICADO
BSA	ALBUMINA SÉRICA BOVINA
CÉLULAS M	CÉLULAS "MICROFOLD"
cm	CENTÍMETRO
DL_{50}	DOSE LETAL MÉDIA
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
dNTP	DESOXINUCLEOTÍDEO TRIFOSFATO
DO	DENSIDADE ÓPTICA
ELISA	"ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY"
FBS	SORO FETAL BOVINO
FRT	"FLP RECOGNITION SITE"
GC	GUANINA/CITOSINA
HIV	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
HU	PROTEÍNA "HEAT UNSTABLE"
IFNγ	INTERFERON GAMA
IgA	IMUNOGLOBULINA A
IgG	IMUNOGLOBULINA G
IL	INTERLEUCINA
IP	ILHA DE PATOGENICIDADE
kb	KILO BASE (1000 PARES DE BASES NUCLEOTÍDICAS)
kV	KILO VOLTS
LA	MEIO LURIA AGAR
LB	MEIO LURIA BERTANI
log	LOGARITMO NA BASE 10
LPS	LIPOPOLISSACARÍDEOS
M	MOLAR
Mϕ	MACRÓFAGOS
M9	MEIO MÍNIMO
MAI	"MOVING AVERAGE INTERPOLATION"
mg	MILIGRAMA
mL	MILILITRO

mm	MILÍMETRO
mM	MILIMOLAR
MOI	MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO
mRNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO MENSAGEIRO
MV	METIL VIOLOGEN (PARAQUAT)
N	NORMAL
ng	NANOGRAMA
nm	NANÔMETRO
NK	CÉLULA "NATURAL KILLER"
nt	NUCLEOTÍDEOS
OPD	"o-PHENYLENEDIAMINE DIHYDROCHLORIDE"
ORF	"OPEN READING FRAME"
P1	"PRIMING SITE 1"
P2	"PRIMING SITE 2"
PAMPS	"PATHOGEN ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS"
pb	PARES DE BASES NUCLEOTÍDICAS
PBS	TAMPÃO FOSFATO SALINA
PBS-T	TAMPÃO FOSFATO SALINA COM 0,05% DE TWEEN® 20
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
PMN	LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES
PMSF	FLUORETO DE FENILMETILSULFONIL
q.s.p.	QUANTIDADE SUFICIENTE PARA
RNAse "free"	LIVRE DE RIBONUCLEASE
RNI	INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE NITROGÊNIO
ROI	INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE OXIGÊNIO
RPMI	MEIO "ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE"
SCV	"*Salmonella* CONTAINING VACUOLE"
SNT	*Salmonella* NÃO TIFÓIDE
SOC	MEIO "SUPER OPTIMAL CATABOLITE REPRESSION"
SPI	"*Salmonella* PATHOGENICITY ISLAND"
SS	MEIO *Salmonella-Shigella*
ST	*Salmonella enterica* Typhimurium
STi	*Salmonella enterica* I 4, [5], 12:i:-

Taq	*Thermus aquaticus*
TNFα	FATOR DE NECROSE TUMORAL
TTSS	SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III
UFC	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA
UFP	UNIDADE FORMADORA DE PLACA
W	WATTS
µF	MICROFARADAY
µg	MICROGRAMA
µL	MICROLITRO
µm	MICRÔMETRO
µM	MICROMOLAR
~	APROXIMADAMENTE
®	MARCA REGISTRADA
°C	GRAUS CELSIUS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01. Visão geral de uma infecção local provocada por *Salmonella enterica* Typhimurium em humanos. (Página 04)

Figura 02. Representação esquemática da distribuição bacteriana de *S. enterica* nos tecidos do hospedeiro. (Página 08)

Figura 03. Vetor plasmidial pKD46, utilizado para a expressão dos genes γ, β e *exo* do fago λ sob controle do promotor P_{araB} para a recombinação homóloga de fragmentos lineares de DNA. (Página 16)

Figura 04. Esquema demonstrativo das etapas de construção das linhagens mutantes. (Página 17)

Figura 05. Representação esquemática da estratégia de mutagênese proposta pelo sistema λRed, ilustrando as etapas de transformação. (Página 18)

Figura 06. Cassetes de recombinação dos genes alvo para a construção das linhagens mutantes. (Página 40)

Figura 07. Confirmação por PCR das linhagens mutantes Δ*hha*, Δ*hupA*, Δ*hupB,* Δ*hupA*Δ*hupB,* Δ*dps* e Δ*hfq* de *S. enterica* após transdução com o fago P22. (Página 42)

Figura 08. Eliminação do cassete de resistência ao cloranfenicol em mutantes Δ*hupA* e Δ*hupB* de *S. enterica* Typhimurium. (Página 43)

Figura 09. Construção da linhagem duplo mutante 662STΔ*hupA*Δ*hupB* pelo nocaute do gene *hupB* e substituição do gene *hupA* pelo gene *cat*. (Página 44)

Figura 10. Detecção do gene de invasão *invE*, essencial à patogenicidade de *Salmonella*. (Página 49)

Figura 11. Detecção do gene de virulência *spvC* do plasmídio de virulência pSLT, presente tanto nas linhagens selvagens quanto nas recombinantes. (Página 49)

Figura 12. Caracterização prévia do crescimento das linhagens selvagens 607STi e 662ST, estabelecendo uma relação entre a absorbância (DO_{600nm}) e o tempo. (Página 50)

Figura 13. Comparação do padrão de crescimento *in vitro* das linhagens selvagem 607STi e recombinante 607STiΔ*hha*. (Página 51)

Figura 14. Curva de crescimento *in vitro* das linhagens selvagem 662ST e mutante 662STΔ*dps*. (Página 52)

Figura 15. Curva de crescimento da linhagem mutante 662STΔ*hfq* em comparação à selvagem 662ST. (Página 52)

Figura 16. Curva de crescimento *in vitro* dos mutantes HU em relação à linhagem selvagem. (Página 53)

Figura 17. Invasão e sobrevivência intramacrofágica exibidas pela linhagem selvagem de *S. enterica* 662ST e respectivos mutantes HU. (Página 55)

Figura 18. Ensaio de invasão e multiplicação das linhagens selvagens 607STi e 662ST e recombinantes 662ST∆*dps*, 662ST∆*hfq* e 607STi∆*hha* no interior de macrófagos da linhagem J774. (Página 56)

Figura 19. Ensaio de resistência a Intermediários Reativos de Oxigênio (ROI). (Página 58)

Figura 20. Ensaio de resistência a Intermediários Reativos de Nitrogênio (RNI). (Página 59)

Figura 21. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com 10^3 (A) e 10^5 (B) UFC das linhagens 662ST, 662ST∆*hfq* e 662ST∆*dps* via intraperitoneal. (Página 62)

Figura 22. Sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com mutantes HU via intraperitoneal. (Página 63)

Figura 23. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c após inoculação intraperitoneal com as linhagens selvagem 607STi e recombinante 607STi∆*hha*, nas doses indicadas na legenda do gráfico. (Página 64)

Figura 24. Sobrevivência de camundongos BALB/c após a administração oral das linhagens ∆*dps* e ∆*hfq* nas doses indicadas na legenda do gráfico, sendo cada grupo composto por 03 animais. (Página 65)

Figura 25. Sobrevivência de animais infectados oralmente com diferentes doses, indicadas na legenda do gráfico, das linhagens selvagem 607STi e mutante ∆*hha*. (Página 66)

Figura 26. Sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com a linhagem recombinante 662ST∆*hupA* em diferentes doses. (Página 67)

Figura 27. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com diferentes títulos, indicados na legenda do gráfico, da linhagem mutante 662ST∆*hupB*. (Página 68)

Figura 28. A inoculação via oral da linhagem recombinante 662ST∆*hupA*∆*hupB* permitiu a sobrevivência de 100% dos animais infectados com todas as doses testadas, evidenciando sua avirulência em camundongos BALB/c. (Página 69)

Figura 29. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados oralmente com 10^6 (A) 10^7 e 10^8 (B) UFC das linhagens selvagem e recombinantes HU. (Página 71)

Figura 30. Ensaio piloto de sobrevivência de camundongos BALB/c imunizados oralmente com 10^6 UFC da linhagem mutante 607STi∆*hha* e posteriormente desafiados com 10^7 UFC da linhagem selvagem 607STi (n=3). (Página 74)

Figura 31. Ensaio de longevidade com imunização única de camundongos BALB/c com 10^7 e 10^8 UFC da linhagem duplo mutante de *S. enterica* ∆*hupA*∆*hupB*, seguido por desafio após 60 e 70 dias, respectivamente, com 10^7 UFC da linhagem selvagem 662ST (dose 1000 vezes superior a DL_{50}). (Página 76)

Figura 32. Proteção induzida pela imunização com a linhagem duplo recombinante 662ST∆*hupA*∆*hupB*. (Página 78)

Figura 33. Ensaio de imunização com 1 e 2 doses (10^8 UFC) da linhagem recombinante 662ST∆*hupA*∆*hupB* e desafio após 30 dias com as doses letais de 10^6 e 10^7 UFC da linhagem selvagem

662ST, respectivamente. (Página 79)

Figura 34. Detecção de anticorpos de mucosa IgA em amostras fecais de camundongos BALB/c imunizados com 2 doses da linhagem duplo mutante *S. enterica* 662ST∆*hupA*∆*hupB*. (Página 82)

Figura 35. Ensaio imunoenzimático para a detecção de imunoglobulinas séricas IgG anti-*Salmonella*, presentes no soro de animais imunizados com 2 doses da linhagem recombinante 662ST∆*hupA*∆*hupB*. (Página 83)

Tabela 01. *Primers* utilizados na construção do cassete de recombinação. (Página 23)

Tabela 02. Condições das reações de PCR para a amplificação do cassete de recombinação. (Página 23)

Tabela 03. *Primers* de detecção (DT) utilizados para confirmação da mutagênese das linhagens transformadas. (Página 26)

Tabela 04. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para detecção dos genes *invE* e *spvC*. (Página 30)

Tabela 05. Densidades bacterianas aplicadas para o cultivo em LA com paraquat (MV, 10 mM). (Página 57)

Tabela 06. DL_{50} de linhagens de *S. enterica* inoculadas via oral em camundongos BALB/c. (Página 73)

Tabela 07. Ensaio qualitativo de colonização e persistência da linhagem duplo mutante 662ST∆*hupA*∆*hupB* em órgãos de camundongos BALB/c. (Página 80)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 01

1.1. *Salmonella enterica*..... 01

1.1.1. Classificação e identificação de sorovariedades..... 01

1.1.2. Epidemiologia 02

1.1.3. Patogenicidade e mecanismos de virulência..... 03

1.1.4. Indução da resposta imune..... 08

1.2. Vacinas vivas de *Salmonella*..... 10

1.3. Expressão de antígenos heterólogos por vacinas multifatoriais..... 11

1.4. O nucleóide bacteriano e os genes *hha*, *hupA*, *hupB*, *dps* e *hfq*..... 13

1.5. Nocaute gênico por meio do sistema λRed 15

2. OBJETIVOS..... 19

3. JUSTIFICATIVAS..... 20

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 21

4.1. Linhagens bacterianas e condições de cultura..... 21

4.2. Animais..... 21

4.3. Construção das linhagens recombinantes..... 22

4.3.1. Extração do DNA plasmidial e genômico..... 22

4.3.2. Construção do cassete de recombinação..... 22

4.3.3. Preparo das células competentes e Eletroporação..... 24

4.3.4. PCR para confirmação da mutagênese..... 25

4.3.5. Eliminação do gene de resistência a antibiótico..... 26

4.3.6. Propagação, Titulação e Transdução com o bacteriófago P22..... 27

4.4. Caracterização fenotípica e genotípica das linhagens recombinantes..... 29

4.4.1. Confirmação da presença de genes de virulência *invE* e *spvC*..... 29

4.4.2. Sequenciamento de nucleotídeos..... 30

4.4.3. Sorologia..... 31

4.4.4. Curva de crescimento *in vitro*..... 31

4.4.5. Invasão e sobrevivência em Macrófagos..... 32

4.4.6. Resistência a Intermediários Reativos de Oxigênio (ROI)..... 33

4.4.7. Resistência a Intermediários Reativos de Nitrogênio (RNI)..... 34

4.5. Análise *in vivo* da atenuação das linhagens recombinantes..... 34
4.6. Proteção e Desafio..... 35
4.7. Determinação da Dose Letal Média..... 35
4.8. Colonização e persistência em órgãos..... 35
4.9. Avaliação da resposta imune..... 36
4.9.1. Coleta e processamento de soro para detecção de anticorpos séricos..... 36
4.9.2. Coleta e processamento de material fecal para detecção de anticorpos de mucosa.. 36
4.9.3. Preparo de antígenos brutos..... 37
4.9.4. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)..... 37
4.9.4.1. Detecção de imunoglobulinas IgG anti-*Salmonella*..... 37
4.9.4.2. Detecção de imunoglobulinas IgA anti-*Salmonella*..... 38
4.10. Determinação do título de anticorpos..... 39
4.11. Análises estatísticas..... 39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40
5.1. Construção e identificação das linhagens recombinantes..... 40
5.1.1. Construção do cassete de recombinação..... 40
5.1.2. Confirmação da mutagênese..... 41
5.1.3. Desenvolvimento da linhagem duplo mutante..... 42
5.2. Caracterização das linhagens recombinantes..... 45
5.2.1. Sequenciamento de nucleotídeos..... 45
5.2.2. Confirmação da presença de genes de virulência..... 48
5.2.3. Teste de aglutinação em lâmina..... 49
5.2.4. Curva de crescimento *in vitro*..... 50
5.2.5. Invasão e multiplicação no interior de macrófagos 54
5.2.6. Resistência a Intermediários Reativos de Oxigênio (ROI)..... 57
5.2.7. Resistência a Intermediários Reativos de Nitrogênio (RNI)..... 58
5.3. Atenuação e proteção no modelo murino..... 60
5.3.1. Inoculação intraperitoneal..... 60
5.3.2. Inoculação intragástrica..... 64
5.3.3. Determinação da DL_{50}..... 72
5.3.4. Imunização e Desafio..... 73

5.4. Colonização e persistência em órgãos..... 80
5.5. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)..... 81
5.5.1. Detecção de imunoglobulinas de mucosa IgA anti-*Salmonella*..... 81
5.5.2. Detecção de imunoglobulinas séricas IgG anti-*Salmonella*..... 82
6. CONCLUSÕES..... 85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 87
8. APÊNDICE..... 93

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Salmonella enterica*

1.1.1. Classificação e identificação de sorovariedades

Salmonella enterica é uma espécie bacteriana gram negativa, anaeróbia facultativa, flagelada, intracelular facultativa e pertence à família *Enterobacteriaceae*.

A nomenclatura mais adotada para o gênero *Salmonella* segue o sistema proposto na década de 80 por Le Minor e Popoff, o qual reconhece apenas duas espécies de *Salmonella*, *S. enterica* e *S. bongori*, apesar de não seguir as regras do "Código Bacteriológico". Devido a isso, uma comissão judicial do Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos elaborou um documento, nomeado "Opinion 80", com a intenção de resolver discrepâncias entre os inúmeros sistemas de nomenclatura vigentes (Tindall *et al.*, 2005).

Em seu trabalho, Le Minor e Popoff ainda reconhecem a existência de seis subespécies dentro da espécie *Salmonella enterica*, sendo elas *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Tindall *et al.*, 2005).

O sistema de classificação de Kauffmann-White classifica o gênero *Salmonella* em sorotipos, baseados na imunoreatividade a estruturas de superfície, como os antígenos somáticos e flagelares (CDC, 2004). De acordo com esse sistema, atualmente há mais de 2500 sorovariedades de *Salmonella enterica* (Switt, 2009).

Os antígenos somáticos "O" são constituídos por lipopolissacarídeos (LPS), normalmente compostos por 4 a 6 açúcares, designados por números. Os grupos "O", determinados pela variação dos antígenos "O", são classificados em letras. Por exemplo, a sorovariedade Typhimurium pertence ao Grupo B ou O:4. Fatores "O" adicionais podem estar associados ao grupo e nesse caso os múltiplos fatores são separados por vírgulas (CDC, 2004).

Os antígenos flagelares "H" são compostos por flagelinas, que são as subunidades estruturais da porção filamentosa do flagelo. As extremidades das flagelinas são conservadas, dando ao filamento sua estrutura característica. A variação antigênica provém da região central das flagelinas, que fica exposta à superfície. *Salmonella* possui uma característica única entre as enterobactérias, sendo esta a capacidade de expressão de dois antígenos "H" diferentes, codificados pelos genes *fliC* e *fljB*. Normalmente, a expressão desses genes é coordenada, de tal forma que apenas um antígeno é expresso a cada momento. Os antígenos flagelares são referidos

como antígenos de fase 1 e 2, sendo que há sorovariedades monofásicas, ou seja, que expressam apenas um tipo de flagelina, como por exemplo, a variante 4,[5],12:i:-, que expressa apenas o antígeno de fase 1 (i:- refere-se à ausência de variação flagelar) (Switt, 2009).

A classificação de sorovariedades pode ainda valer-se de antígenos Vi, que são antígenos capsulares presentes em apenas alguns sorotipos, como Typhi (Switt, 2009).

1.1.2. Epidemiologia

As frequentes gastroenterites em humanos são em grande parte provocadas por isolados de *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium, também responsáveis por causar variáveis condições patológicas em animais produtores de alimento, como bovinos, suínos e aves, gerando consideráveis perdas econômicas (Mastroeni *et al.*, 2001). Além disso, sorovariedades monofásicas 4,[5],12:i:- surgem como emergentes, sendo cada vez mais associadas a surtos de salmonelose nos mais diversos países (Switt *et al.*, 2009; Soyer *et al.*, 2009).

A cada ano ocorrem cerca de 1,3 bilhão de casos de doenças em humanos provocadas por *Salmonella*, que abrangem desde desconfortáveis diarréias até graves infecções sistêmicas, como a febre tifóide (McGhie *et al.*, 2009).

Embora nos países desenvolvidos a ocorrência de febre entérica já não seja prevalente, em alguns países em desenvolvimento, principalmente os situados na Ásia e na região norte da África, as febres tifóide e paratifóide, ocasionadas respectivamente pelas sorovariedades Typhi e Paratyphi de *Salmonella enterica*, ainda compõem um problema de saúde recorrente. Somente as doenças provocadas pelas sorovariedades Typhi e Paratyphi totalizam aproximadamente 22 milhões de casos e 20 0000 mortes anuais ao redor do mundo (Andrews-Polymenis *et al.*, 2010).

Na África subsaariana casos de salmonelose não-tifóide (SNT) com complicações levando à bacteremia são mais frequentes do que as febres tifóide e paratifóide. A incidência de SNT tem aumentado ainda mais em associação com a predisposição consequente de outras infecções, como as ocasionadas por HIV e *Plasmodium falciparum*. A situação é tão grave que a ocorrência de SNT com bacteremia em crianças africanas já se igualou aos casos de malária (Andrews-Polymenis *et al.*, 2010).

Estudos genômicos de epidemiologia, utilizando métodos baseados em sequência, caracterizaram isolados de SNT obtidos em Malawi, revelando que 75% das linhagens eram constituídas por *Salmonella enterica* sorovariedade Typhimurium (Andrews-Polymenis *et al.*,

2010).

Embora atualmente a maioria das infecções por *Salmonella* possam ser tratadas com antibiótico, a rápida emergência de sorovariedades multiresistentes a antibióticos tem dificultado a adoção dos tratamentos convencionais, sendo necessárias novas medidas de prevenção e/ou tratamento.

1.1.3. Patogenicidade e mecanismos de virulência

Normalmente *S. enterica* infecta o hospedeiro pela ingestão de água ou alimentos contaminados e então essa bactéria é transportada via gastrointestinal até atingir o íleo, onde inicia a infecção pela colonização de células M, enterócitos e células dendríticas presentes na mucosa intestinal. As bactérias que atingem a submucosa são internalizadas por macrófagos residentes, porém *Salmonella* também é detectada em uma variedade de células não fagocíticas, devida a sua capacidade de invasão *in vivo* (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009).

Algumas das infecções provocadas por *S. enterica* são locais, afetando apenas o intestino, onde a estimulação de respostas inflamatórias, como a produção de citocinas e liberação de prostaglandinas por PMNs (leucócitos polimorfonucleares), contribui para a ocorrência de diarréia (Figura 01). Já na febre tifóide ou em casos de salmonelose que evoluem para infecção sistêmica, esse patógeno sobrevive aos macrófagos intestinais, disseminando-se pelo fígado e baço via corrente sanguínea e sistema linfático (McGhie et al, 2009). O risco de infecção endovascular a partir de uma gastroenterite aumenta proporcionalmente com a idade e sua ocorrência é estimada em 10% dentre as pessoas com mais de 50 anos. Da mesma forma, são mais suscetíveis os neonatos e pessoas com o sistema imune suprimido. Complicações ocasionadas por bacteremia incluem endocardite, aneurisma e osteomielite (Darby & Sheorey, 2008).

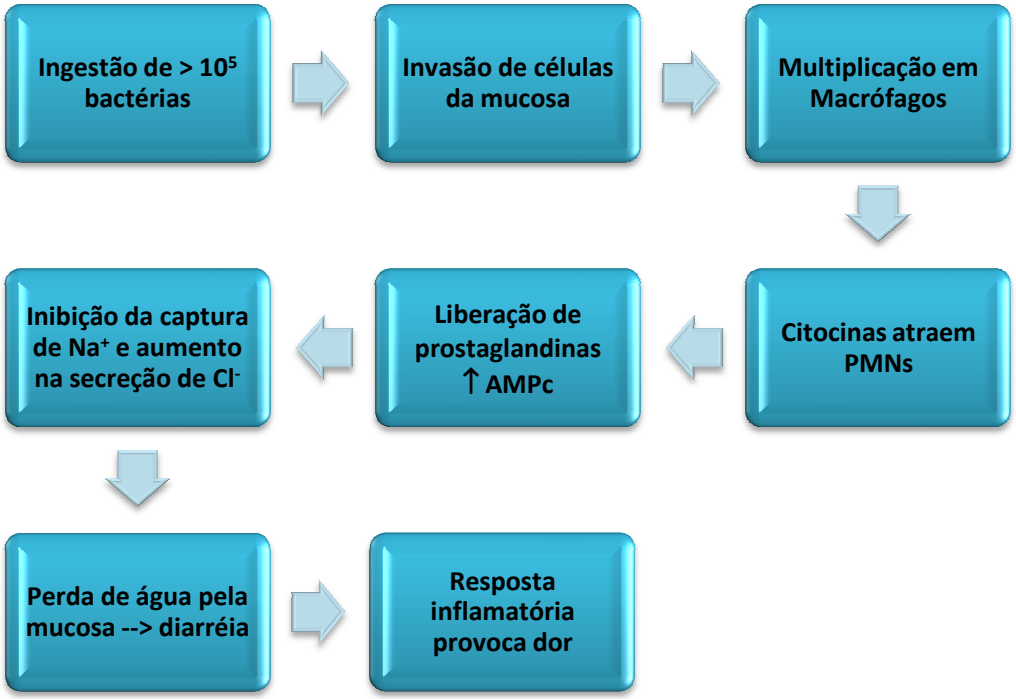


Figura 01. Visão geral de uma infecção local provocada por *Salmonella enterica* Typhimurium em humanos. Inicialmente ocorre a ingestão da bactéria em uma quantidade maior do que 10^5 UFC, embora já tenham sido relatados casos de infecção com densidades bacterianas inferiores. *S. enterica* invade as células da mucosa e multiplica-se no interior de macrófagos. Nesta etapa, a bactéria também pode penetrar na corrente sanguínea, causando choque séptico, embora a frequência desse caso seja inferior ao apresentado no fluxograma. A presença de *S. enterica* estimula a produção de citocinas como IL-8, atraindo PMNs, como os neutrófilos, ao sítio de infecção. Os PMNs liberam prostaglandinas, que atuam elevando a atividade da adenilato ciclase nas células intestinais. Consequentemente, ocorre um aumento na concentração de AMPc, inibindo a captura de sódio e elevando a secreção de cloro, o que acarreta um desequilíbrio osmótico na mucosa intestinal. Um mecanismo de compensação para a perda de íons é a saída de água das células da mucosa para o lúmen, ocasionando a marcante diarréia secretória. A dor abdominal associada à gastroenterite é consequência das respostas inflamatórias produzidas pelo hospedeiro (figura elaborada a partir de Salyers & Whitt, 2002).

Como *S. enterica* é um patógeno intracelular facultativo, a capacidade de sobreviver e se replicar no interior de células do hospedeiro é determinante para o sucesso da infecção. Os

principais fatores de virulência de *S. enterica* Typhimurium são constituídos por tolerância a ambientes ácidos, o que permite ultrapassar a barreira gástrica, a presença de adesinas, a capacidade de invasão das células da mucosa e a sobrevivência no interior de macrófagos não ativados (Salyers & Whitt, 2002).

S. enterica Typhimurium produz uma variedade de adesinas, que incluem fímbrias do tipo I, fímbrias codificadas pelo plasmídio de virulência pSLT, fímbrias polares longas e fímbrias agregativas. As fímbrias codificadas por genes do plasmídio pSLT proporcionam a ligação da bactéria as microvilosidades dos enterócitos, enquanto as fímbrias polares longas fixam as bactérias nas placas de Peyer. Já as fímbrias agregativas, como o próprio nome sugere, promovem a adesão de uma bactéria à outra (Salyers & Whitt, 2002).

Bactérias patogênicas evoluíram estratégias para a colonização de variados nichos presentes em seus hospedeiros multicelulares. A transferência gênica horizontal é uma força evolutiva que permitiu a rápida aquisição de complexos fatores de virulência, denominados "Ilhas de Patogenicidade" (Mastroeni & Maskell, 2006).

O conceito sobre as ilhas de patogenicidade (IPs) foi introduzido em 1983 por Hacker e colaboradores para descrever regiões genéticas instáveis de linhagens patogênicas de *Escherichia coli*. Posteriormente, foram identificadas IPs adicionais em vários grupos de patógenos, geralmente apresentando características como a presença de um ou mais genes de virulência, de elementos genéticos móveis e composição de bases nucleotídicas substancialmente diferente do genoma do organismo como um todo, como o conteúdo de GC e a preferência de códons (Mastroeni & Maskell, 2006).

Em *S. enterica* foram identificados grandes agrupamentos de genes de virulência, identificados como IPs. Devido a isso, essas regiões passaram a ser denominadas SPI ("*Salmonella* Pathogenicity Island"). A Ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) está presente em *S. bongori* e em todas as subespécies de *S. enterica*, promovendo a divergência do gênero *Salmonella* de outras enterobactérias. A SPI-1 é uma região genômica estável, com aproximadamente 40 kb e responsável pela aquisição de ferro, assim como pelo TTSS (Sistema de Secreção do Tipo III), composto por cerca de 30 genes que promovem a invasão celular. Outro sistema TTSS, ativado no ambiente intracelular, está presente na Ilha de Patogenicidade 2 (SPI-2), oriundo de eventos independentes de transferência gênica horizontal. Além disso, SPI-2 é essencial para a proliferação de *S. enterica* nos órgãos do hospedeiro, assim como para a habilidade de causar infecções

sistêmicas. Outras SPIs também já foram identificadas em *Salmonella*, como SPI-3, responsável pela captação de Mg^{2+}, além das SPI-4, SPI-5, SPI-6, SPI-7, SPI-8, SPI-9 e SPI-10, nem todas com funções claramente identificadas (Mastroeni & Maskell, 2006).

Conforme mencionado, a invasão das células do hospedeiro, assim como a sobrevivência intracelular, são dependentes de sistemas de secreção do tipo III. Adicionalmente, também há outros efetores cruciais nesses processos, como a enzima superóxido dismutase, que confere proteção contra ROI (Intermediários Reativos de Oxigênio) produzidos por fagócitos do hospedeiro, além dos flagelos e fímbrias, que aumentam a capacidade de invasão das células (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009).

A entrada de *Salmonella* nas células do hospedeiro pode ocorrer por processos distintos. Fagócitos profissionais, como macrófagos, reconhecem padrões moleculares de patógenos presentes em *Salmonella*, como LPS e flagelinas, e internalizam a bactéria. Alternativamente, pode ocorrer a invasão ativa de *S. enterica* nas células do hospedeiro promovida pelo TTSS codificado por SPI-1 da bactéria.

Esse sistema de secreção é um processo altamente específico, constituído por proteínas efetoras, que induzem a reestruturação do citoesqueleto da célula do hospedeiro, resultando em aberturas na membrana ("membrane ruffles") que permitem a passagem da bactéria, conforme já revelado por estudos com microscopia eletrônica de varredura (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009; Ohl & Miller, 2001). A abertura da membrana celular é promovida por um conjunto de proteínas, como SipA, que liga-se à actina e inibe sua despolimerização, além de romper junções oclusivas entre as células, gerando uma abertura confinada a uma região específica da membrana (Salyers & Whitt, 2002; McGhie *et al.*, 2009).

Um mecanismo alternativo de internalização independente de SP-1 foi descrito. Nesse caso, não ocorre interação com células M, mas sim o engolfamento por células dendríticas, que abrem as junções entre a membrana basolateral de células epiteliais, levando algumas bactérias para a superfície da mucosa. Nesse mecanismo, a invasão das placas de Peyer não é requerida e as células dendríticas apresentam os antígenos aos linfócitos T auxiliares CD4+, acelerando a disseminação bacteriana (Sansonetti, 2004).

Após a entrada nas células, *S. enterica* restringe sua localização a um compartimento intracelular próprio e distinto, denominado "*Salmonella*-containing vacuole" (SCV). Com a expressão de SPI-2 e seus efetores, *Salmonella* promove a biogênese e manutenção de SCV,

desatrelando-o da via endocítica, evitando a fusão lisossômica. A proteína bacteriana SifA recruta vesículas para o aumento da membrana do SCV, impedindo a ruptura do vacúolo e transição para o lisossomo. A maturação do SCV ocorre e então há uma aproximação ao complexo de Golgi, onde a replicação bacteriana intracelular tem início. Neste estágio formam-se filamentos tubovesiculares e a acumulução de F-actina ao redor do fagossomo, enclausurando e protegendo a bactéria nesse sítio. No momento adequado há uma expressão aumentada das proteínas SseJ e SpvB, envolvidas na desintegração do SCV, liberando as bactérias (Sansonetti, 2004; McGhie *et al.*, 2009).

Durante a invasão, a proteína SipB ativa a cisteína-protease Caspase-1 no interior dos macrófagos residentes. A protease Caspase-1 induz a apoptose em macrófagos resultando na saída de *S. enterica* dessas células. Caspase-1 também cliva os precursores de 1L-1β e IL-18, produzindo citocinas bioativas. As interleucinas 1L-1β e IL-18 acentuam a inflamação local e promovem a infiltração de PMNs na mucosa intestinal, resultando na internalização da bactéria por essas células. A ativação da Caspase-1 mediada por SipB ocasiona um aumento da colonização bacteriana nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, indicando que a saída dos macrófagos e localização no compartimento extracelular e/ou dentro de PMNs é benéfica à *S. enterica* nesse estágio da infecção (Sansonetti, 2004).

A dinâmica de expansão de *S. enterica* consiste em um aumento no número de células infectadas, mais do que no aumento do número de bactérias no interior dos fagócitos. Formam-se lesões patológicas nos tecidos, que apresentam pequeno aumento de tamanho e elevado aumento de células infectadas por lesão, ou seja, as bactérias saem das células infectadas, espalhando-se por outras células, formando vários focos de infecção (Mastroeni & Maskell, 2006) (Figura 02).

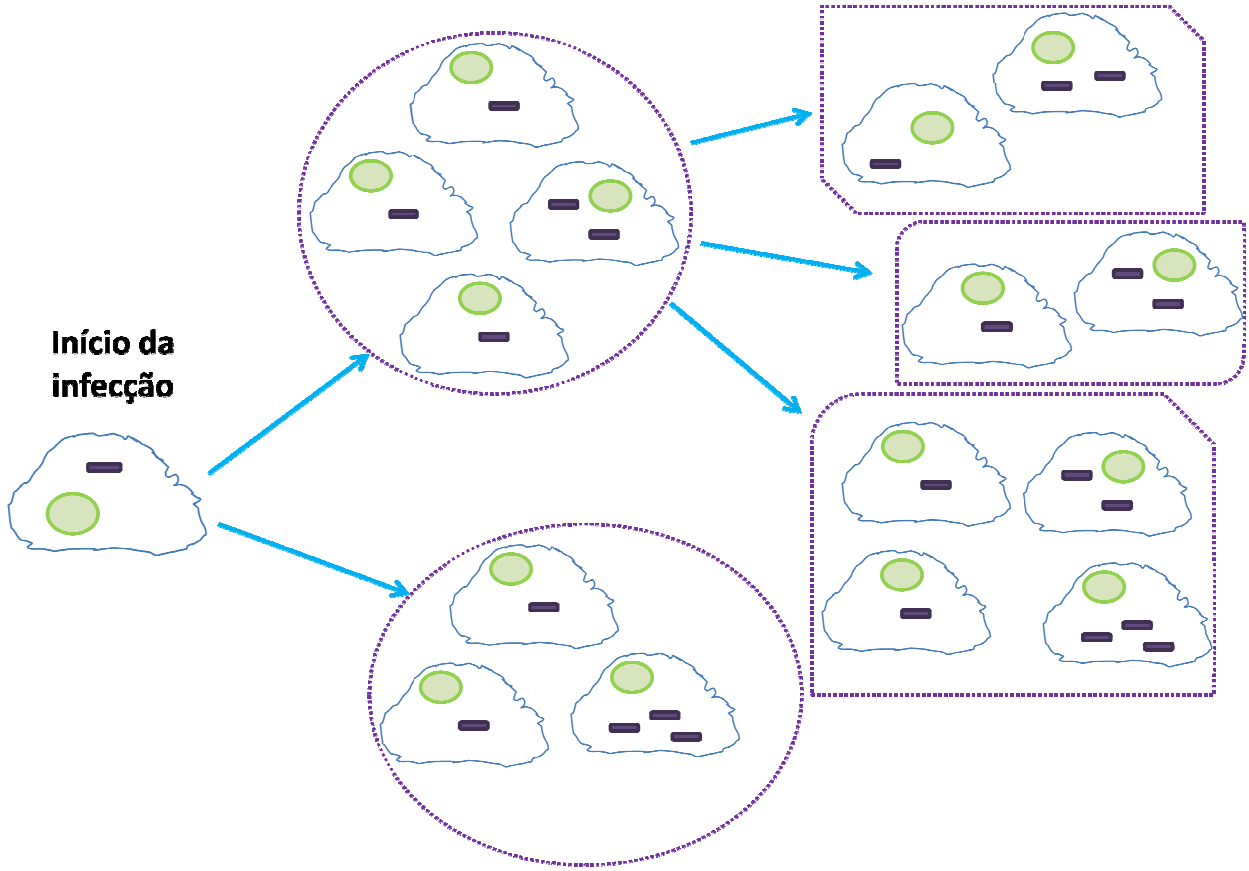


Figura 02. Representação esquemática da distribuição bacteriana de *S. enterica* nos tecidos do hospedeiro. O crescimento das bactérias (retângulos roxos) resulta em um aumento na quantidade de lesões patológicas (linhas tracejadas) e um aumento do número de fagócitos infectados (células azuis) por lesão, gerando vários focos de infecção (figura elaborada a partir de Mastroeni & Maskell, 2006).

1.1.4. Indução da resposta imune

Embora *Salmonella* consiga vencer a barreira ácida do estômago, o número de bactérias sobreviventes a esse ambiente reduz-se a cerca de 1% da população inicial, sendo que dessas, apenas 5% são capazes de atravessar o epitélio intestinal. Quando presente na mucosa intestinal, *S. enterica* provoca uma reação inflamatória aguda pela ativação de citocinas e mediadores inflamatórios (Trebichavský *et al*., 2010).

O reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro ocorre devido à presença de receptores a estruturas vitais microbianas, que atuam como padrões moleculares de reconhecimento, denominanadas PAMPs (“Pathogen Associated Molecular Patterns”). Os lipopolissacarídeos (LPS) constituem um dos principais PAMPs de *Salmonella* e são reconhecidos por TLR4 (“Toll Like

Receptor 4") e proteínas plasmáticas. As flagelinas também são potentes indutores inflamatórios, responsáveis pela resposta IL-8 e consequente infiltração de neutrófilos (Trebichavský *et al*., 2010).

S. enterica Typhimurium promove uma inflamação local e sistêmica, associada à indução de respostas de linfócitos T tipo TH1 e à produção de anticorpos IgA e IgG. A imunidade inata regula o crescimento exponencial de *S. enterica*, mas muitas vezes é incapaz de impedir totalmente esse crescimento nos tecidos, acarretando infecções letais. Um fator contribuinte para o óbito é o choque séptico endotóxico induzido por LPS, já que em resposta a essa molécula o hospedeiro excessivamente produz citocinas como TNFα, IL1β, IL6, IL12 e IFNγ (Mastroeni & Maskell, 2006).

Já em infecções subletais, uma resposta imune adaptativa complexa é ativada, suprimindo o crescimento exponencial de *S. enterica* nos tecidos e possibilitando a sobrevivência do hospedeiro. Essa resposta adaptativa não é antígeno-específica, mas sim resultado da migração de células inflamatórias derivadas da medula óssea, que requerem a ação de mediadores imunológicos, como citocinas. Dessa forma, essa resposta imunológica não depende de células B e T, conforme comprovam experimentos com animais irradiados com raios-X, reconstituídos com células da medula óssea deficientes em células T e posteriormente injetados com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8, que ainda assim mostraram-se eficientes em controlar o crescimento de *S. enterica* na fase inicial da infecção. Da mesma forma, experimentos foram realizados com camundongos *nu/nu* (deficientes em células T) e H21-Aβ$^{-/-}$ (deficientes em CD4^{+} e células T), que também foram capazes de deter o crescimento de *S. enterica* (Mastroeni & Maskell, 2006).

Apesar disso, a imunidade mediada por células é importante nas infecções provocadas por *S. enterica*, pois é responsável pela produção de anticorpos, que sozinhos podem conferir proteção em uma salmonelose reincidente. As células T modulam a produção de anticorpos, contribuindo para o estabelecimento de uma resposta humoral de longa duração, além de determinar o perfil isotípico de imunoglobulinas específicas. As células B são responsáveis pela produção dos anticorpos e também estão envolvidas na apresentação de antígenos para células T CD4+ (Mastroeni & Maskell, 2006).

Nos tecidos há focos de infecção, nos quais ocorre infiltração de PMNs nos primeiros dias, gerando uma lesão patológica (Figura 02). Gradualmente ocorre uma substituição de PMNs por células morfonucleares, confinando as bactérias ao foco inicial de infecção. A falha na formação da

lesão patológica resulta em crescimento anormal e disseminação de bactérias pelos tecidos do hospedeiro. A participação de TNFα é essencial na formação dessas lesões patológicas (Mastroeni & Maskell, 2006).

Também é crucial a atuação de IFNγ no sentido de ativar as células imunológicas recrutadas, acentuando suas funções antibacterianas. Por exemplo, IFNγ é um dos mediadores capazes de ativar macrófagos (Mϕ), aumentando a fusão fagossomo-lisossomo, assim como a produção de derivados do óxido nítrico (NO). Na fase inicial da infecção, a principal fonte de IFNγ provém de Mϕ, células NK e neutrófilos. Na ausência de IFNγ ocorre o óbito do hospedeiro devido ao crescimento incontrolado de bactérias, apesar da elevada quantidade e distribuição de macrófagos nos tecidos colonizados (Mastroeni & Maskell, 2006).

1.2. Vacinas vivas de *Salmonella*

Vacinas vivas de *Salmonella* são altamente desejáveis por induzir uma resposta imune local na mucosa intestinal e uma estimulação humoral a nível sistêmico. Além disso, são facilmente administradas via oral, apresentando-se mais seguras e baratas do que vacinas injetáveis. Ainda, apresentam o potencial de atuar como vacinas multifatoriais, "entregando" antígenos heterólogos de outras doenças ao sistema imune do hospedeiro.

Diversos genes já foram alvo de deleção para o desenvolvimento de linhagens atenuadas de *Salmonella*, sendo alguns deles *aroA*, *cya* e *crp*, *phoP*, *ompR*, *htrA* e *cdt*. A linhagem χ3895 constitui um exemplo de linhagem atenuada de *Salmonella*. Ela foi desenvolvida a partir da linhagem virulenta UK-1 e sua atenuação foi promovida pela deleção dos genes *cya* e *crp*, que codificam a adenilato ciclase e a proteína receptora de AMPc, respectivamente (Zhang *et al.*, 1999).

A atenuação excessiva de linhagens bacterianas pode render uma pobre estimulação do sistema imune, como ocorreu no estudo humano com a linhagem Ty445, uma *S. enterica* Typhi com deleção nos genes *phoP/phoQ* e *aroA* (Kotton & Hohmann, 2004). Mutantes auxotróficos para purinas também se mostraram atenuados, porém incapazes de desencadear uma resposta imune adequada (Salyers & Whitt, 2002). Por outro lado, uma atenuação insuficiente pode resultar em reatividade, infecção sintomática e outros efeitos colaterais indesejados, principalmente em hospedeiros com sistema imune deprimido (Kotton & Hohmann, 2004).

Tentativas com vacinas mortas de *Salmonella* já foram realizadas, no entanto as mesmas

mostraram-se reatogênicas, além de induzir uma pobre resposta imune (Mastroeni *et al.*, 2001).

Vários vetores vacinais bacterianos vivos já foram caracterizados em estudos com animais e humanos, no entanto, grande parte não foi licenciada para uso clínico. Algumas das vacinas vivas bacterianas disponíveis no mercado são: *Salmonella enterica* Typhi Ty21a, *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR e *Mycobacterium bovis* BCG (Kotton & Hohmann, 2004).

A vacina Ty21a (Vivotif®, Crucell/Berna Biotech Ltda.) foi criada a partir de Ty2, uma linhagem mantida em laboratório desde 1918. Quando isolada, Ty2 já possuía uma mutação alterando o quadro de leitura do gene *rpoS*, sendo posteriormente submetida à mutagênese química com nitrosoguanidina, gerando uma mutação no gene *galE*, que resulta na síntese alterada de LPS. Embora essa vacina tenha sido licenciada e ainda seja utilizada, para induzir o sistema imune de humanos de modo efetivo são necessárias administrações de 3 a 4 doses. Devido a isso, é altamente desejável o desenvolvimento de vacinas eficazes com um número inferior de doses (Kotton & Hohmann, 2004).

Ainda há disponível uma outra vacina contra *S. enterica* Typhi, denominada Typhim Vi® (Pasteur Merieux). Essa vacina é composta pelo antígeno Vi de *S. enterica* Typhi purificado, sendo que este antígeno só é encontrado nas sorovariedades Typhi, Paratyphi C e Dublin. Embora essa vacina seja administrada intramuscularmente em uma dose única, a proteção contra a febre tifóide não é total, alcançando 55 a 75% da população vacinada. Além disso, essa vacina é ineficaz em crianças com menos de 02 anos de idade (Cheminay & Hensel, 2008). Dessa forma, embora haja duas vacinas internacionais licenciadas contra a febre tifóide, vacinas mais eficientes ainda são necessárias.

1.3. Expressão de antígenos heterólogos por vacinas multifatoriais

Bactérias atenuadas são vetores vacinais multifatoriais atrativos, pois são capazes de induzir respostas imunes no hospedeiro pela expressão de antígenos de outros patógenos. Vetores bacterianos mimetizam uma infecção natural, estimulando os sistemas imune humoral, celular e de mucosa do hospedeiro. Adicionalmente, bactérias entéricas naturalmente possuem moléculas imunoestimulatórias, como LPS e flagelinas (Kotton & Hohmann, 2004). Dessa forma, vacinas multifatorias de *Salmonella* podem proteger o hospedeiro não só de infecções provocadas por *S. enterica*, mas também por outro patógeno a partir do qual o antígeno heterólogo foi derivado (Mastroeni & Maskell, 2006).

Salmonella foi a primeira bactéria a ser utilizada para a expressão de antígenos heterólogos. Em 1981, Formal e colaboradores demonstraram que a linhagem atenuada Ty21a de *S. enterica* Typhi expressando um antígeno de superfície de *Shigella* foi capaz de proteger camundongos contra o desafio com outras sorovariedades de Typhi e também com *Shigella sonnei*.

Já foram realizados testes não só com antígenos heterólogos de bactérias, fungos, vírus e parasitas, mas também foi explorada a expressão de moléculas não convencionais, como adjuvantes, antígenos tumorais e citocinas (Kotton & Hohmann, 2004).

Além das vantagens mencionadas, vetores bacterianos vivos apresentam a facilidade de produção em larga escala a baixos custos e sem necessidade de refrigeração quando liofilizados (Kotton & Hohmann, 2004).

Um exemplo de indução de resposta imune e proteção contra um patógeno específico pela expressão de antígenos por *Salmonella* foi demonstrado por Oliveira *et al.* (2007). Oliveira e colaboradores inseriram o antígeno VapA de *Rhodococcus equi*, uma bactéria patogênica a equinos, na linhagem atenuada χ3987 Δ*cya* Δ*crp* Δ*asd* de *S. enterica* contendo o plasmídio pYA3137, que demonstrou-se eficaz em proteger camundongos contra o desafio letal com *R. equi*.

No entanto, nem sempre a proteção contra um patógeno específico é bem sucedida. Em 2010, Torres-Escobar e colaboradores desenvolveram um vetor de *Salmonella* expressando o antígeno PsaA de *Yersinia pestis*. Nesse caso, apesar de demonstrada uma elevada produção de anticorpos IgG e IgA contra o antígeno PsaA, sua expressão não foi suficiente para proteger os animais vacinados contra desafios com doses letais de *Yersinia pestis*.

Sendo assim, algumas otimizações são necessárias para atingir uma expressão continuada do antígeno heterólogo e suficiente para desencadear uma resposta imune protetora no hospedeiro. Alguns dos possíveis problemas são: a instabilidade plasmidial, a expressão de moléculas heterólogas a níveis tóxicos, o enovelamento incorreto do antígeno expresso ou sua degradação por enzimas do hospedeiro. Há várias alternativas para solucionar esses impasses, como o uso de sistemas letais balanceados, no qual as bactérias que perdem o plasmídio são incapazes de sobreviver, como por exemplo, bactérias Δ*asd* com plasmídios expressando esse gene vital à *Salmonella.* Outras estratégias compõe o uso de de promotores induzíveis *in vivo*, como *pagC*, ativado somente no interior de macrófagos ou a integração cromossômica do gene heterólogo, resultando em uma expressão estável do antígeno (Mastroeni *et al*., 2001).

1.4. O nucleóide bacteriano e os genes *hha, hupA*, *hupB*, *dps* e *hfq*

Uma região do genoma de *Salmonella* denominada Ilha de Patogenicidade 2 (SPI-2) codifica um sistema de secreção do tipo III (TTSS), essencial para a sobrevivência no interior de células eucarióticas. Os componentes SsrA-SsrB são responsáveis pela regulação positiva desse sistema de secreção. Como o TTSS só é ativado frente a sinais ambientais, há não só um sistema de regulação positiva, mas também um de repressão, que promove a inibição dos genes de virulência de SPI-2 (Silphaduang *et al*., 2007).

A proteína YdgT foi caracterizada como reguladora negativa dos genes de SPI-2, no entanto YgdT não é a única repressora, pois mutantes nulos *ydgt* ainda são capazes de promover a inibição dos genes de SPI-2. Hha foi originalmente descrita como uma indutora da expressão da hemolisina em *E.coli*, tendo posteriormente sido caracterizada por Fahlen *et al.* (2000) como reguladora negativa de genes de invasão em *Salmonella*, assim como YdgT. Segundo Fahlen *et al*., Hha é uma proteína repressora do gene *hilA*, um ativador transcricional de genes de invasão, em especial dos relacionados ao sistema de secreção do tipo III codificado pelos genes de SPI-1. Posteriormente, a proteína Hha também foi descrita como a principal repressora dos genes de SPI-2, até que a bactéria se depare com sinais ambientais favoráveis para ativação da virulência, como acidez e baixo nível de Mg^{2+} e PO_4^{3-} (Silphaduang *et al*., 2007).

Embora *hha* seja um repressor de genes de virulência, a ausência desse fino controle é crucial para a patogênese de *Salmonella*. A regulação não só positiva, mas também negativa, de genes de virulência é uma estratégia evolutiva essencial para o sucesso de patógenos (Silphaduang *et al*., 2007). Devido a isso postulamos que seria interessante verificar os efeitos sobre a virulência de *Salmonella* causados pela deleção do gene *hha*.

Há poucos dados na literatura sobre a proteína HU ("Heat Unstable") e *Salmonella*, embora haja mais relatos dessa proteína em *Escherichia coli*. Ainda assim, os trabalhos descrevem o sistema funcional da proteína, sem investigações sobre a possível atenuação promovida pela deleção dos genes *hupA* e/ou *hupB*, que codificam as subunidades α e β da proteína HU, respectivamente.

O gene *hupA* de *Salmonella* foi comparado ao gene *hupA* de *E.coli* por clonagem e sequenciamento, o que revelou que as subunidades HUα dessas bactérias são idênticas, com sequências externas às ORFs altamente conservadas (Higgins & Hillyard, 1988). Essas evidências sugerem que HU exerce as mesmas funções em *E.coli* e em *S. enterica*. Os estudos realizados em

E.coli revelam que a proteína HU tem efeitos pleiotrópicos, afetando processos celulares como compactação do DNA, replicação, recombinação, regulação gênica, crescimento termo-sensível, adaptação na fase estacionária de crescimento, lisogenia e transposição do bacteriófago Mu, além de ser capaz de se ligar inespecificamente ao DNA (Bi *et al.*, 2009).

Berger e colaboradores (2009) construíram um duplo mutante Δ*hupA*Δ*hupB* de *E.coli* para verificar alterações na estrutura genômica promovida pela ausência da proteína HU. Nesse estudo foi observado que a ausência de HU provoca um rearranjo espacial no padrão de transcrição, causando uma perturbação da homeostase topológica, compensada por uma maior acessibilidade da topoisomerase a sítios do DNA.

Como estudos de atenuação não foram realizados para mutantes HU, decidimos construir linhagens recombinantes a partir da deleção dos genes *hupA* e *hupB* individualmente e simultaneamente para a verificação da atenuação da virulência em *Salmonella*.

Além disso, um estímulo extra para a construção do mutante Δ*hupB* foi a incompatibilidade de dados publicados por Fahlen *et al*. (2000) e Schechter *et al.* (2003) em relação aos efeitos de *hupB* na regulação da transcrição de *hilA*, um ativador transcricional crucial de genes envolvidos na invasão realizada por *Salmonella enterica*.

Neste trabalho também foram construídas as linhagens Δ*dps* e Δ*hfq*, como fonte de parâmetro para a comparação dos resultados, uma vez que há dados na literatura mencionando que a deleção de ambos os genes ocasionam a atenuação da virulência em *S. enterica*.

A proteína Dps ("DNA binding Protein from Starved cells") acumula-se durante a fase "midi log" a estacionária de crescimento, embora também seja expressa na fase exponencial. Dps previne o DNA de danos oxidativos na fase estacionária de crescimento, prevenindo a formação de radicais hidroxila e protegendo contra o peróxido de hidrogênio (Halsey *et al.*, 2004; Marshall *et al.*, 2000). Testes *in vivo* por meio de inóculo intraperitoneal em camundongos indicaram a atenuação de uma linhagem Δ*dps* (Halsey *et al.*, 2004).

A proteína Hfq ("Host Factor for phage Q_β") é uma reguladora pós-transcricional que modula a estabilidade e tradução de mRNAs. Além disso, Hfq também atua na expressão e secreção de fatores de virulência de *Salmonella* (Sittka *et al*., 2007). Linhagens Δ*hfq* mostraram-se avirulentas quando inoculadas intraperitonealmente em camundongos BALB/c (Sittka *et al*., 2007; Ansong *et al*., 2009).

1.5. Nocaute gênico por meio do sistema λRed

A maioria das bactérias impede a incorporação de fragmentos lineares de DNA devido ao seu sistema de exonucleases, que prontamente degradam ácidos nucléicos lineares. Uma estratégia desenvolvida por bacteriófagos para a inserção do seu conteúdo gênico em cromossomos bacterianos é a presença de um sistema próprio de recombinação homóloga, como o apresentado pelo fago λ. O bacteriófago λ possui os genes γ, β e *exo*, que em conjunto permitem a inserção de fragmentos lineares de DNA no cromossomo bacteriano. A proteína Gam codificada pelo gene γ inibe o sistema de exonucleases bacteriano, enquanto Exo é uma exonuclease 5'-3' que degrada o terminal 5' de fragmentos lineares de DNA. Após a ação de Exo, a proteína Bet, expressa pelo gene β, se liga ao terminal 3' gerado no DNA linear, promovendo seu anelamento a uma sequência complementar de DNA, presente no cromossomo bacteriano (Datsenko & Wanner, 2000).

Em 2000, Datsenko e Wanner lançaram mão desse elegante sistema de recombinação homóloga para promover a deleção de genes cromossômicos de *Escherichia coli* K-12. No sistema λRed, elaborado por esses pesquisadores, os genes do fago λ foram inseridos nos plasmídios pKD46 e pKD20, sob controle do promotor induzível *araB*. Sendo assim, a expressão dos genes γ, β e *exo* ocorre mediante a introdução do açúcar L-arabinose no meio de cultura, permitindo a recombinação de fragmentos lineares de DNA inseridos na bactéria por eletroporação. Neste trabalho, optamos pela utilização do plasmídio pKD46, de tal forma que a primeira etapa para a construção das linhagens mutantes consistiu na transformação das linhagens selvagens com o plasmídio pKD46 (Figura 03).

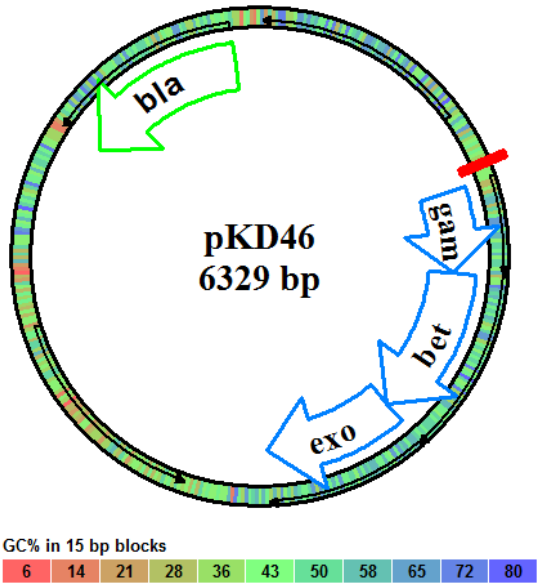


Figura 03. Vetor plasmidial pKD46, utilizado para a expressão das proteínas Gam, Bet e Exo (setas azuis) do fago λ sob controle do promotor P_{araB} (em vermelho) para a recombinação homóloga de fragmentos lineares de DNA. A transformação de bactérias com esse plasmídio torna-as resistentes à ampicilina pela expressão do gene *bla* (β-lactamase) (seta verde). Figura construída no programa pDRAW32, a partir da sequência de nucleotídeos depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) sob código AY048746.1.

A etapa subsequente do sistema λRed consiste em substituir uma sequência cromossômica da bactéria por um gene de resistência a antibiótico. A amplificação do gene de resistência a antibiótico é realizada por PCR e utiliza como DNA molde os plasmídios pKD3, pKD4 ou pKD13. Neste trabalho adotamos o plasmídio pKD3, que confere resistência ao cloranfenicol, pela expressão do gene *cat*. Esse gene expressa a proteína cloranfenicol acetil transferase, que transfere grupos acetil ao cloranfenicol, impedindo sua ligação ao ribossomo e consequente interferência no processo de tradução. Para que a recombinação ocorra exatamente em um sítio cromossômico específico, é necessário construir um cassete de recombinação com sequências homólogas ao gene alvo, denominadas H1 e H2 (“Homology extensions”). Os *primers* utilizados na reação de PCR para a construção do cassete de recombinação são constituídos por sequências denominadas P1 e P2 (“Priming sites”), utilizadas para o anelamento ao plasmídio pKD3. A região de anelamento plasmidial flanqueia o gene *cat*, garantindo sua amplificação. Também são amplificadas

sequências contendo sítios FRT ("FLP Recognition Target"), posteriormente utilizados para a eliminação do gene de resistência a antibiótico (Figura 04).

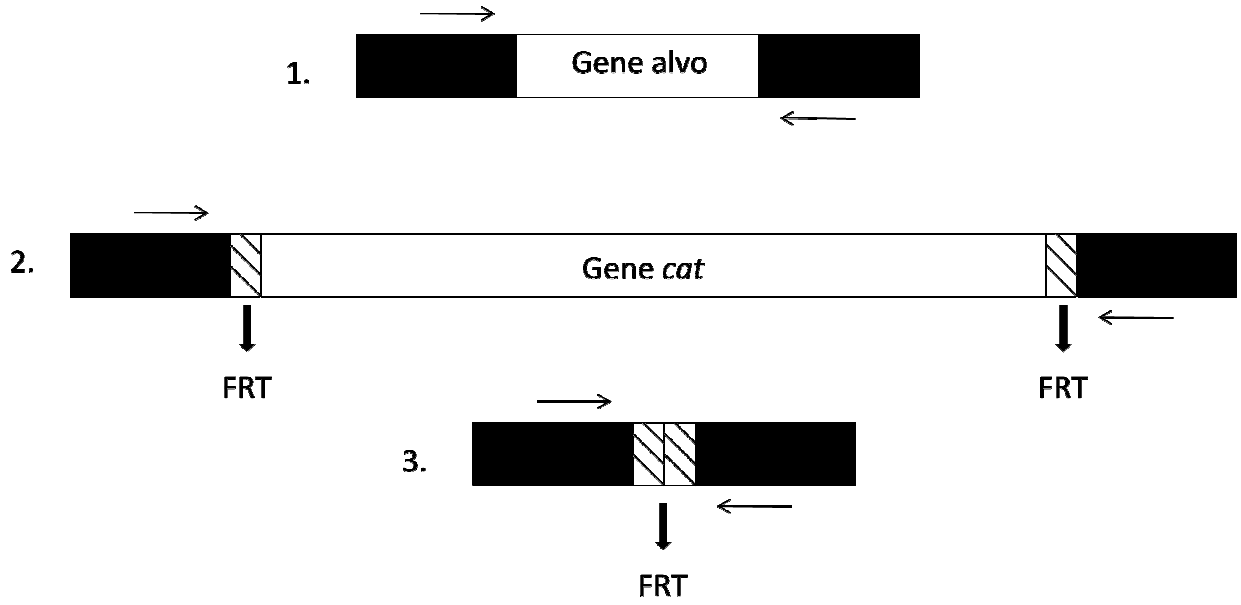


Figura 04. Esquema demonstrativo das etapas de construção das linhagens mutantes. Inicialmente o gene bacteriano alvo da deleção é estabelecido (1), sendo substituído pelo gene *cat* (*chloranphenicol acetyl transferase*) por recombinação homóloga (2). A última etapa consiste na remoção do gene de resistência ao cloranfenicol (3), restando apenas uma "cicatriz", composta por sítios FRT (região hachurada). As setas indicam a direção de amplificação promovida pelos *primers* de detecção, que flanqueiam o gene alvo, gerando fragmentos de DNA de tamanhos dinstintos, detectáveis por PCR. Na linhagem selvagem, o tamanho amplificado corresponde ao gene alvo íntegro (1), já na linhagem recombinante resistente ao cloranfenicol, o fragmento amplificado corresponderá ao gene *cat* e regiões flanqueadoras, compondo um tamanho de ~1,1 kb (2). Nas linhagens recombinantes sem o gene *cat*, apenas uma cicatriz com tamanho aproximado de 80-100 pb é amplificada (3).

Após o estabelecimento da linhagem recombinante, o plasmídio pCP20 é utilizado para eliminar a resistência ao antibiótico cloranfenicol. As linhagens são transformadas com esse plasmídio e depois o mesmo é removido pela incubação das linhagens bacterianas a 43 °C, já que o pCP20 possui origem de replicação termo-sensível, assim como o plasmídio pKD46. No local do gene original permanece apenas uma cicatriz com cerca de 82 a 85 nt, composta por um sítio de

ligação do ribossomo, um "start" códon (Met) e seis pautas de leitura, todas compostas por "stop" códons (Figura 05).

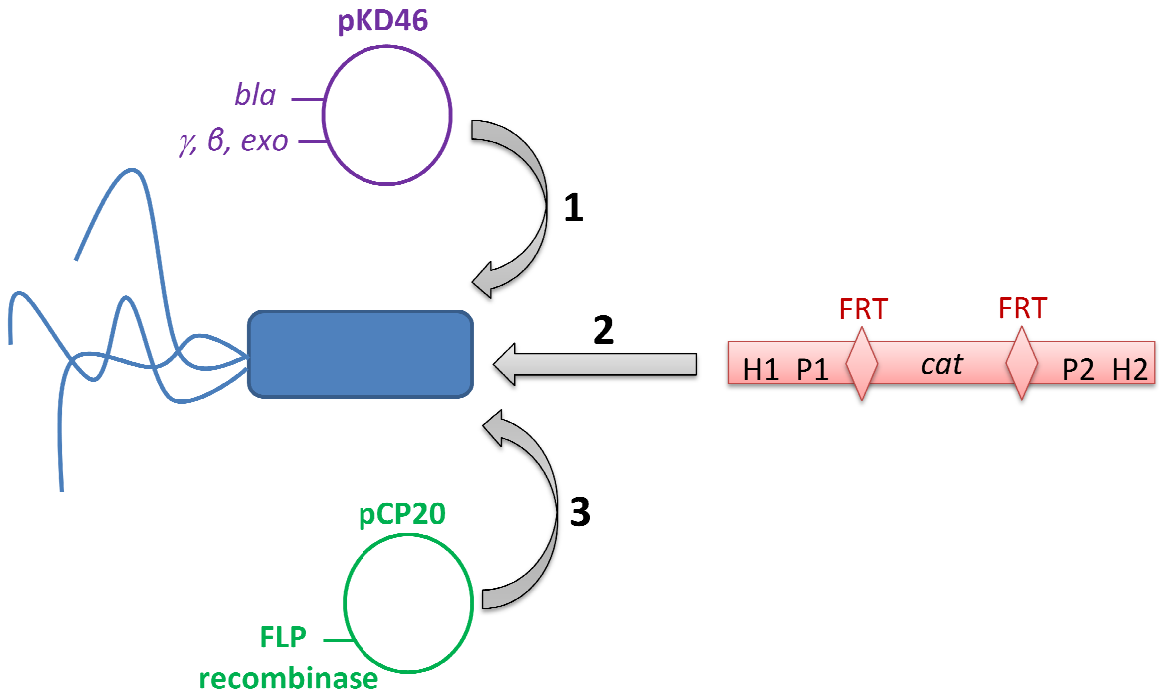


Figura 05. Representação esquemática da estratégia de mutagênese proposta pelo sistema λRed, ilustrando as etapas de transformação. A etapa 1 consiste na inserção do plasmídio pKD46, que contém os genes γ, β e *exo* do fago λ, que permitem a inserção de fragmentos lineares de DNA no cromossomo bacteriano, além de conferir resistência à ampicilina pela expressão do gene *bla*. Na etapa 2 está representado o cassete de recombinação construído a partir do plasmídio pKD3. Esse cassete é composto pelo gene *cat,* que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol; por sítios FRT, utilizados para excisão do gene *cat*; pelas regiões P1 e P2 ("priming sites"), utilizadas para o anelamento dos *primers* ao plasmídio pKD3 na reação de PCR e pelas regiões H1 e H2 ("homology extensions"), homólogas ao gene alvo, onde ocorre a recombinação no cromossomo bacteriano. Na etapa 3, o gene de resistência a antibiótico é eliminado pela transformação com o plasmídio pCP20, que expressa uma recombinase que atua sobre os sítios FRT, removendo o gene *cat*.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram:

i) construir linhagens recombinantes de *Salmonella enterica* por meio da deleção de genes específicos, pois hipotetizamos que esses genes seriam essenciais à virulência e por isso sua deleção promoveria a atenuação da bactéria patogênica;

ii) avaliar, por meio de caracterizações genotípicas e fenotípicas, se as linhagens recombinantes perderam ou adquiriram características quando comparadas à linhagem selvagem original;

iii) verificar, através de ensaios *in vivo* no modelo murino da salmonelose, se a deleção de genes específicos ocasionou a atenuação da virulência das linhagens recombinantes, permitindo sua utilização como vetores vacinais.

3. JUSTIFICATIVAS

Embora linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* já tenham sido desenvolvidas por outros grupos de pesquisa, até então não foram construídas linhagens que apresentassem o balanço ideal entre atenuação e indução do sistema imune do hospedeiro.

Devido a isso, desenvolvemos linhagens recombinantes ainda não avaliadas quanto à atenuação e proteção no modelo murino da salmonelose, visando determinar se a deleção dos genes estabelecidos promove um nível de atenuação que permita a utilização das linhagens recombinantes como vetores vacinais.

Além disso, é sabido que diferentes mutações que promovem a atenuação da virulência, também conferem distintas propriedades imunogênicas às linhagens recombinantes. Desta forma, a ampliação do conhecimento acerca das propriedades imunogênicas de diferentes mutantes de *S. enterica* é de extrema importância. Soma-se a isso a possibilidade do desenvolvimento de linhagens bacterianas em nosso País, evitando assim o pagamento de "royalties" a governos e/ou empresas estrangeiras.

Além dos fatores já mencionados, linhagens atenuadas de *Salmonella* são desejáveis como vacinas vivas por apresentarem o potencial de proteger o hospedeiro não só contra a salmonelose, mas também contra outras doenças não relacionadas, como as provocadas por vírus, parasitas, entre outros, pela inserção de antígenos heterólogos dos patógenos, que são entregues ao sistema imune do hospedeiro quando expressos pela bactéria recombinante. Portanto, linhagens atenuadas e caracterizadas de *S. enterica* abrem a possibilidade de atuarem como excelentes vetores vacinais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas e condições de cultura

As linhagens selvagens de *Salmonella enterica* utilizadas neste trabalho foram isoladas de pacientes humanos com quadro de enterite no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (HCRP), compondo a coleção do laboratório. Essas cepas foram anteriormente caracterizadas quanto aos fatores de patogenicidade de *S. enterica* e avaliadas quanto à sensibilidade antimicrobiana (TSA). O estudo de tais linhagens foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

As linhagens selecionadas para este trabalho pertencem a dois sorotipos de *Salmonella enterica*, sendo denominadas *S. enterica* Typhimurium 662ST e *S. enterica* I 4,5,12:i:-, sem variação flagelar, 607STi.

Os meios de cultura utilizados foram LB, LA, LB semi-sólido (Sambrook e Russel, 2001), MacConkey (Oxoid® do Brasil Ltda, São Paulo, SP), Meio Mínimo, SS (DifcoTM®, BD) e SOC (Sambrook e Russel, 2001).

Quando necessário, glicose 1 M esterilizada foi adicionada para enriquecer o meio de cultura. Para a seleção de linhagens resistentes, antibióticos apropriados foram aplicados ao meio, sendo estes ampicilina ou cloranfenicol, na concentração final de 100 μg/mL e 25 μg/mL, respectivamente.

Para o modo de preparo dos meios e soluções consultar o apêndice (seção 8).

4.2. Animais

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em camundongos BALB/c/AnUnib, considerados como o modelo murino da salmonelose. Foram utilizadas fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Biologia da Unicamp.

4.3. Construção das linhagens recombinantes

4.3.1. Extração do DNA plasmidial e genômico

Para a extração dos plasmídios acessórios pKD46, pKD3 e pCP20, que compõe o sistema λRed de mutagênese, foi utilizado o "kit PerfectPrep Plasmid Midi" (Eppendorf®).

O DNA genômico das linhagens selvagens e mutantes foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989) para confirmação da identidade por PCR, e posteriormente com o "kit Wizard® Genomic DNA Purification" (Promega®) para o sequenciamento de nucleotídeos.

4.3.2. Construção do cassete de recombinação

Para a construção do cassete de recombinação foram desenhados oligonucleotídeos contendo regiões homólogas ao plasmídio pKD3 (DNA molde) e ao gene alvo da deleção. Devido a isso, os iniciadores ficaram maiores do que o tamanho convencional de 20 pb, contendo cerca de 60 pb (Tabela 01).

Para desenhar os *primers*, as sequências do projeto genoma de *S. enterica* (NC_003197) (Washington University, St. Louis, USA) e do plasmídio pKD3 (AY048742) foram acessadas a partir do banco de dados NCBI ("National Center for Biotechnology Information"). A qualidade dos oligonucleotídeos foi avaliada por critérios como a formação de grampos ("hairpins") e conteúdo de GC, entre outros, por meio do programa "*primer3*" (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

Uma reação de PCR com gradiente de temperaturas foi realizada, visando obter a temperatura de anelamento ideal, definida como 66 °C.

Tabela 01. *Primers* utilizados na construção do cassete de recombinação. Em negrito, está destacada a parte comum a todos os *primers*, correspondente à região de anelamento ao plasmídio pkD3, denominada P1 para os *primers* "forward" e P2 para os *primers* "reverse".

Primers	**Sequência (5'-3')**
hupA-f	TAGCAAGCGATAAACACATTGTAAGGATAACTTATGAACAAG**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC**
hupA-r	TTCGATAAAACTGTTCACAGTTATGCGTCTTACTTAACTG**CCATATGAATATCCTCCTTAGTTC**
hupB-f	GGTGCGATATAAATTATAAAGAGGAAGAGAAGAGTGAATAAA**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC**
hupB-r	CTTTGTCACATCCCCCGAGGGGATCACGCTTAGTTTACCG**CCATATGAATATCCTCCTTAGTTC**
hha-f	GTTAGTTTGTCTTGTTAAAAATTATTACAATCATAGGTAGAATTT**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC**
hha-r	AGGCAGATAACACCTGCGTGTTCTCTAAAAAGTAATGTAGCGTGA**CATATGAATATCCTCCTTAGT**
dps-f	ACCTGGGACACAAACATCAAGAGGATATGAGATTATGAGT**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC**
dps-r	CCTGCAACTCGAAGTATTCAGGGTAGAGATAGATTTATT**CCATATGAATATCCTCCTTAGTTC**
hfq-f	AAAGTACAAATAAGCATATAAGGAAAAGAGAATGGCTAAG**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC**
hfq-r	CCCCGACATGGATAAACAGCGCGTGAACTTATTCAGTCT**CCATATGAATATCCTCCTTAGTTC**

As concentrações e os volumes dos reagentes utilizados na PCR estão demonstrados na tabela 02. A reação foi submetida a um aquecimento inicial de 94 °C por 2 minutos e posteriormente a 30 ciclos de denaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 66 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos.

Tabela 02. Condições das reações de PCR para a amplificação do cassete de recombinação.

Reagentes	**Volume**	**Concentração final**
Tampão (10 x)	5 µL	1 x
dNTP mix (10 mM)	1 µL	0,2 mM cada
$MgCl_2$ (50 mM)	2 µL	2 mM
Primers (10 µM cada)	2 µL	0,4 µM
Taq DNA Polimerase (5 U/µL)	1 µL	5 U
DNA	2 µL	10-12 ng
Água "RNAse free" q.s.p.	50 µL	--

4.3.3. Preparo das células competentes e Eletroporação

Primeiramente, o preparo das células competentes e eletroporação consistiu na inserção do plasmídio pKD46 nas linhagens selvagens 662ST e 607STi. Após a transformação, as linhagens foram denominadas 662pKD46 e 607pKD46 e estocadas com glicerol 40% a -80 °C. Posteriormente, essas linhagens foram transformadas com o cassete de recombinação gerado por PCR com o plasmídio pKD3.

A princípio, o preparo das células competentes foi realizado pelo cultivo das linhagens 662ST e 607STi em 5 mL de LB durante a noite (37 °C e 150 rpm). No dia seguinte, 500 µL do pré-inóculo foram adicionados a 50 mL de LB fresco e as culturas foram incubadas a 37 °C e 150 rpm até atingirem a DO de 0,6 a um comprimento de onda de 600 nm. As culturas foram brevemente resfriadas em gelo e submetidas à centrifugação por 10 minutos, a 5000 g e 4 °C (Rotor F-34-6-38, Centrifuge 5804R Eppendorf®). O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram recuperadas pela adição de 50 mL de água MilliQ autoclavada. Essa etapa foi repetida 2 vezes, sendo as demais ressuspensões realizadas com glicerol 10%.

Para o preparo das células competentes 662pKD46 e 607pKD46 o mesmo procedimento foi realizado, mas com as exceções de que ampicilina (100 µg/mL) e L-arabinose (2mM) foram adicionadas ao meio LB. O açúcar L-arabinose é necessário para a indução dos genes γ, β e *exo*, presentes no plasmídio pKD46, já que a expressão dos mesmos é controlada pelo promotor P_{araB}. Além disso, o cultivo foi realizado a 30 °C, para poupar o plasmídio pKD46, que possui origem de replicação termo-sensível.

As células competentes foram utilizadas para a eletroporação logo após o preparo, na proporção de 40 a 100 µL de célula para 10 a 200 ng de DNA. As condições de eletroporação foram 1,8 kV, 25 µF e 200 W, sendo adotadas cubetas de 0,1 cm (BioAgency® Laboratories Inc. 4824 N.W. 116, USA).

Após a eletroporação com o plasmídio pKD46, as amostras foram rapidamente incubadas em 1 mL de meio SOC a 30 °C e 150 rpm durante 60 a 90 minutos. Posteriormente, as culturas foram cultivadas a 30 °C por 16 a 18 horas em meio LA com ampicilina. Já na eletroporação com o cassete de recombinação, as culturas foram incubadas a 37 °C e as colônias foram selecionadas em LA provido de cloranfenicol.

No dia seguinte, as colônias foram cultivadas nos meios seletivos SS, MacConkey, LA com cloranfenicol e LA com ampicilina. Na segunda etapa de transformação, o teste em meio com

ampicilina foi realizado para a verificação da perda do plasmídio pKD46, pois como a origem de replicação deste plasmídio é termo-sensível, o simples crescimento a 37 °C é suficiente para a inibição da sua replicação.

4.3.4. PCR para confirmação da mutagênese

Nas primeiras eletroporações o DNA das colônias isoladas foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Sambrook *et al*, 1989) para confirmação da deleção do gene alvo por PCR. Posteriormente, foi feita a tentativa de utilizar o material genético diretamente da colônia para a PCR, método esse que se demonstrou eficaz e prático, sendo por isso adotado.

Para realizar a reação dessa forma, uma colônia isolada foi selecionada e diluída em 20 µL de água milliQ autoclavada. Procedeu-se uma reação com volume final de 20 µL, seguindo as proporções: 12 µL de água milliQ esterilizada; 2 µL de tampão (10 x); 1 µL de dNTPs (0,5 mM); 0,8 µL de $MgCl_2$ (2 mM); 1 µL de cada *primer* (0,5 µM); 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (1 U) e 5 µL de DNA (colônia diluída em 20 µL de água) (Datsenko & Wanner, 2000).

A reação foi submetida a um aquecimento inicial de 94 °C por 2 minutos e depois 30 ciclos de denaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50-57 °C (de acordo com os *primers* utilizados) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos.

Os *primers* de detecção (DT) da mutagênese foram desenhados de tal forma a abranger cerca de 100 pb a jusante e a montante do gene alvo para confirmação da deleção, comparando-se sempre com o fragmento da linhagem selvagem, correspondente ao gene alvo íntegro. A sequência desses oligonucleotídeos está demonstrada na Tabela 03. É possível perceber que há dois pares de *primers* de detecção para o gene *hupA*. As primeiras reações foram feitas com os *primers* 1, no entanto detectamos que esses oligonucleotídeos eram promíscuos, pois além do fragmento correspondente ao tamanho esperado, também houve amplificação de um fragmento extra, menor do que a banda recombinante e a banda selvagem (dados não mostrados). Sendo assim, foram desenhados novos *primers* de detecção (hupADT2), que não apresentaram o problema de bandas espúrias.

Tabela 03. *Primers* de detecção (DT) utilizados para confirmação da mutagênese das linhagens transformadas. O *primer* CmDT amplifica a região correspondente ao gene *cat*, que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol, presente apenas nas linhagens recombinantes.

Primers	**Sequência (5'-3')**
hupADT1-f	AGTGCTTTTCTGGCATTTCC
hupADT1-r	ACAGACAAAAGGGGCTGATG
hupADT2-f	CGACTGCGAAGAACGTGATA
hupADT2-r	AAAGCCGCTGGCAGTAAAC
hupBDT-f	TCGTACTTCGAAGGATTCAGG
hupBDT-r	GTTGATGCGCCCTTGTACTT
hhaDT-f	ATCGGTCGGGCAATACAGT
hhaDT-r	TATTGCAACTTTCGCGCTTA
dpsDT-f	GATTCGCTGCGTTTGTACC
dpsDT-r	ACCCACCAAACAGCAAACTC
hfqDT-f	GTTGTTGGTGCTATCGCAGA
hfqDT-r	GTGTACCAGTACCGCCTGCT
CmDT-f	GAACTTCGGAATAGGAACTTCA
CmDT-r	TGTGACGGAAGATCACTTCG

4.3.5. Eliminação do gene de resistência a antibiótico

Para a eliminação do gene *cat*, as linhagens foram cultivadas em 5 mL de LB com cloranfenicol durante a noite a 37 °C. No dia seguinte, 500 µL do pré-inóculo foram adicionados a 50 mL de LB fresco com cloranfenicol e as culturas foram cultivadas durante 3 horas a 150 rpm e 37 °C. O preparo das células competentes foi realizado conforme descrito no item 4.3.3 e então alíquotas com 40 µL de células competentes e 1, 2 ou 3 µL do plasmídio pCP20 foram eletroporadas. As culturas foram rapidamente incubadas em 1 mL de meio SOC a 30 °C durante 1 hora, já que o plasmídio pCP20 possui origem de replicação termo-sensível. Após esse período, as culturas foram plaqueadas em LA com ampicilina e cultivadas durante a noite a 30 °C.

No dia seguinte, as colônias crescidas foram selecionadas individualmente e repicadas em

meio SS com cloranfenicol. As colônias com fenótipo de cor preta foram cultivadas em 3 mL de LB sem antibiótico a 42 °C por 16 a 18 horas para eliminação do plasmídio. Posteriormente, uma reação de PCR foi realizada e as culturas que apresentaram uma "cicatriz" com cerca de 80 pb somada a regiões flanqueadoras, totalizando 100 a 200 pb no local do gene *cat* foram estocadas em glicerol a -80 °C.

4.3.6. Propagação, Titulação e Transdução com o bacteriófago P22

A eletroporação constitui um método eficiente para a transformação de bactérias, no entanto, abre a possibilidade de seleção negativa de lipopolissacarídeos (LPS), cruciais na resposta imune do hospedeiro, já que são potentes imunomodulares e são prontamente reconhecidos por macrófagos (Rosenberger *et al*., 2000). A transdução com o bacteriófago P22 é um método eficaz para resolver esse problema, uma vez que é possível transferir o DNA de uma bactéria transformada por eletroporação para uma bactéria selvagem que não passou pelo processo de seleção de LPS curtos e atuará como receptora do DNA recombinante. A transdução só ocorre em bactérias com LPS normal, pois o sítio de reconhecimento para adsorção do fago P22 é o antígeno "O", composto por unidades repetidas de oligossacarídeos presentes no LPS de *Salmonella* (Gemski & Stocker, 1967).

Antes de realizar a transdução com o bacteriófago P22, foi necessário propagar e titular o mesmo, a fim de estabelecer um estoque para o laboratório e mensurar o título de fagos para determinar a MOI ("Multiplicity of Infection") da transdução.

A propagação do fago P22 HTF ("High Transducing Frequency") foi realizada utilizando a linhagem 662ST selvagem como hospedeira. Para isso, essa linhagem foi submetida a cultivo estático em 3 mL de LB a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, 100 µL do pré-inóculo foram repicados em 5 mL de LB fresco e então a nova cultura foi cultivada a 150 rpm e 37 °C durante 3 horas para atingir a densidade aproximada de 10^8 UFC.mL^{-1}. O fago foi adicionado em uma concentração 10 a 100 vezes menor do que a densidade bacteriana e 5 mL de LB foram adicionados ao meio para fornecer mais nutrientes. A cultura foi novamente incubada durante a noite a 150 rpm e 37 °C. No dia seguinte, as células foram sedimentadas por centrifugação (5000 g por 10 minutos) e o sobrenadante foi filtrado a 0,22 µm (Millipore®) em ambiente esterilizado, para a captação apenas dos fagos. Como controle, o fago foi plaqueado em LA, para verificação de contaminação bacteriana no sobrenadante filtrado.

Para a titulação do fago propagado, a linhagem 662ST foi cultivada em 3 mL de LB sem agitação a 37 °C durante a noite. No dia posterior, 500 µL da bactéria foram adicionados a 3 mL de meio LB semi-sólido derretido e a mistura foi vertida sobre uma placa de Petri. A utilização de LB semi-sólido neste experimento garante a uniformidade no tapete de bactérias que se forma sobre a placa. Logo após, 5 µL de fago puro e em diferentes diluições em solução salina (10^{-3} a 10^{-10}) foram adicionados em triplicata sobre a placa. As placas foram incubadas durante a noite na estufa a 37 °C para contagem da UFP (Unidades Formadoras de Placa) e determinação da densidade de fagos no dia seguinte.

Para realizar a transdução, a bactéria recombinante doadora foi cultivada estaticamente em 3 mL de LB sem antibiótico por 16-18 horas a 37 °C. No próximo dia, uma alíquota de 100 µL do fago foi adicionada a 900 µL de LB fresco, atingindo a densidade aproximada de 10^9 UFP.mL^{-1}. Essa mistura foi acrescentada ao pré-inóculo cultivado, com uma densidade populacional aproximada de 10^9 UFC.mL^{-1}. A cultura resultante foi cultivada na estufa a 37 °C durante a noite. Nesse mesmo dia, a bactéria selvagem (607STi ou 662ST) também foi cultivada estaticamente em 3 mL de LB a 37 °C durante a noite. No terceiro dia, a cultura com a bactéria doadora e o fago foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos a 4 °C, para sedimentação das bactérias. Para garantir o isolamento entre fagos e bactérias, o sobrenadante foi cuidadosamente filtrado em ambiente esterilizado por meio de um filtro com poros de diâmetro 0,22 µm (Millipore®) e transferido para um novo recipiente esterilizado. Como controle o sobrenadante foi estriado em LA para verificação da presença de bactérias.

Alíquotas contendo o fago e a bactéria receptora foram preparadas, seguindo as seguintes proporções:

1. 10 µL de fago + 100 µL de bactéria;
2. 10 µL de fago + 50 µL de bactéria;
3. 50 µL de fago + 50 µL de bactéria;
4. 50 µL de fago + 100 µL de bactéria.

As culturas com fagos e bactérias foram incubadas a 37 °C por 20 minutos para a adsorção. Após esse período, as alíquotas foram plaqueadas em LA com cloranfenicol para a seleção das bactérias que receberam o DNA recombinante. No dia seguinte, as colônias crescidas foram repicadas para os meios seletivos SS, MacConkey com cloranfenicol e novamente LA com

cloranfenicol. Para reconfirmar a identidade das colônias selecionadas, uma nova reação de PCR com os *primers* de detecção foi realizada (vide seção 4.3.4.).

4.4. Caracterização fenotípica e genotípica das linhagens recombinantes

4.4.1. Confirmação da presença dos genes de virulência *invE* e *spvC*

O gene *invE* é essencial à virulência de *Salmonella*, pois a proteína InvE interage com um complexo protéico composto por SipB, SipC e SicA, controlando a translocação de proteínas bacterianas para o hospedeiro (Kubori & Galán, 2002). Sendo assim, *invE* possui participação crucial na invasão promovida por *Salmonella* e devido a isso é importante detectar se os processos de transformação sofridos pelas linhagens recombinantes ocasionaram a perda ou mudança desse gene. De fato, este passo significou apenas um controle para confirmar a identidade das linhagens recombinantes. Os iniciadores utilizados para a reação de PCR e consequente detecção de *invE* estão descritos na tabela 04.

Entre diferentes sorovariedades de *S. enterica* são encontrados elementos genéticos móveis, como plasmídios e pró-fagos. Estudos genômicos comparativos de DNA de variados sorotipos de *S. enterica* revelaram que a maior parte da diversidade existente entre Typhi e Typhimurium provém de plasmídios e fagos lambdóides. Além disso, muitos plasmídios possuem genes de virulência ou de resistência a antibióticos, podendo ser transferidos de uma bactéria a outra por conjugação (Mastroeni & Maskell, 2006).

Cerca de 90% das linhagens de *S. enterica* Typhimurium portam o plasmídio pSLT (90 kb) (Salyers & Whitt, 2002). Por essa razão, é importante avaliar a presença desse plasmídio de virulência nas linhagens recombinantes. A presença do plasmídio pSLT foi verificada pela amplificação do gene *spvC*, já que os plasmídios pSLT possuem uma região comum com cerca de 8 kb, que codifica os genes *spv* ("*Salmonella* plasmid virulence"). Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 04.

Tabela 04. Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para amplificação dos genes *invE* e *spvC*.

Primer	**Sequência (5'-3')**	**Referência**
invE-f	CACCAATATCGCCAGTACGA	Este trabalho
invE-r	CCAGCGAATCGGTAAACAAT	Este trabalho
spvC-f	ACTCCTTGCACAACCAAATGCGGA	Guerra *et al*., 2000
spvC-r	TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATCA	Guerra *et al*., 2000

4.4.2. Sequenciamento de nucleotídeos

Para o sequenciamento de nucleotídeos, primeiramente foram realizadas reações de PCR das regiões alvo utilizando os *primers* de detecção (tabela 03). A verificação dos fragmentos procedeu-se por eletroforese em gel de agarose 1%. Posteriormente, o DNA amplificado foi quantificado e 10-40 ng do produto de PCR foram utilizados para a reação de sequenciamento, em conjunto com 1 µL do reagente "BigDye®", 1 µL do tampão de reação (5 X), 1,6 µM do *primer* e água MilliQ autoclavada para um volume final de 10 µL. As etapas de termociclagem constituíram-se de um aquecimento inicial a 94 °C por 2 minutos e 35 ciclos de denaturação a 94 °C por 20 segundos, anelamento a 51 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 60 segundos.

Ao fim da reação, o produto de PCR foi submetido à precipitação com isopropanol. Para tal, foram adicionados 40 µL de isopropanol, atingindo uma concentração final de 60%. A placa foi submetida a uma breve centrifugação e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a placa foi novamente centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm e uma lavagem com etanol foi realizada. O isopropanol foi removido por inversão da placa e 200 µL de etanol 70% foram adicionados, seguido de centrifugação por 45 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, o etanol foi eliminado por meio de uma breve centrifugação com a placa invertida e incubação a temperatura ambiente para evaporação do etanol restante. A placa foi mantida a 4 °C até a leitura de sequenciamento, realizada no Laboratório de Genômica e Expressão – Unicamp. O sequenciamento foi gentilmente permitido pelo Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e foi realizado na plataforma de sequenciamento "*Applied BioSystems Hitachi*®".

O "site" http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2 foi utilizado para o alinhamento das sequências, em conjunto com o programa "JalView", disponibilizado no mesmo "site" para obtenção da sequência consenso. Para a comparação dos resultados foi utilizado o "site"

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi e as sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) sob os códigos AY048742 e NC_003197, referentes ao plasmídio pKD3 e a *Salmonella enterica* Typhimurium LT2, respectivamente.

4.4.3. Sorologia

Os soros somáticos compõem um sistema prático para a identificação dos grupos sorológicos A, B, C1, C2, D e E, que em conjunto somam 98% dos exemplares de *Salmonella* isolados do ser humano. Os sorotipos Typhimurium e 4,[5],12:i:- utilizados neste trabalho fazem parte do grupo B e apresentam respectivamente os antígenos somáticos "O" 1,4,5,12 e 4,5,12 (Edwards & Ewing, 1972).

Para realizar o teste sorológico foi utilizado o método de aglutinação em lâmina, no qual uma colônia isolada é depositada sobre uma lâmina para microscopia limpa e então uma gota do soro somático polivalente (PROBAC® do Brasil) é adicionada sobre a colônia. A placa deve ser movimentada por aproximadamente 1-2 minutos, até que a mistura bactéria/antisoro fique homogênea e ocupe uma área com cerca de 1,5 cm de diâmetro. O teste sorológico tem resultado positivo quando a amostra sofre aglutinação na placa. Uma amostra de *E. coli* BL21(DE3) foi utilizada como controle negativo.

4.4.4. Curva de crescimento *in vitro*

A caracterização do crescimento de linhagens mutantes é essencial para uma primeira observação de mudanças fenotípicas em comparação com a linhagem selvagem, assim como para a obtenção de uma relação "título *versus* tempo de crescimento".

Sendo assim, as primeiras curvas foram realizadas com as linhagens selvagens 607STi e 662ST e posteriormente com todas as linhagens recombinantes. Para tal, um pré-inóculo a partir do estoque foi cultivado em 5 mL de LB, com adição de cloranfenicol para as linhagens mutantes, e incubado na estufa a 37 °C durante a noite sem agitação.

No dia seguinte, 500 µL do pré-inóculo foram adicionados a 50 mL de LB com 2% de glicose e a cultura foi incubada a 37 °C e 150 rpm. Para a padronização das condições de cultivo, todas as linhagens foram crescidas em LB enriquecido com 2% de glicose.

Nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas alíquotas de 100 µL foram retiradas para a diluição seriada em PBS (pH 7,4). A determinação da densidade populacional foi realizada pelo método da

gota, no qual 20 µL de cada diluição é plaqueada em triplicata sobre meio LA. As placas são então incubadas durante a noite a 37 °C para a contagem das colônias no dia seguinte, considerando a diluição que apresente entre 20 a 200 colônias por gota para determinação da $UFC.mL^{-1}$ de cada período, estabelecendo então uma curva de crescimento (Barbosa *et al*., 1995). Relações "tempo *versus* DO" foram estabelecidas apenas para algumas linhagens.

4.4.5. Invasão e sobrevivência em Macrófagos

Uma característica crucial à patogenicidade de *Salmonella* é a capacidade de invasão e sobrevivência no interior de macrófagos. Por ser um patógeno intracelular facultativo, essa bactéria é capaz de se replicar em compartimentos intracelulares, como o interior do vacúolo de macrófagos. Os macrófagos desempenham funções essenciais ao hospedeiro como a fagocitose, a apresentação de antígenos aos linfócitos e a regulação da resposta imune (Aderem & Underhill, 1999).

Para verificar se as linhagens mutantes mantiveram a capacidade de invasão e sobrevivência intramacrofágica, foi realizado um ensaio com a cultura de macrófagos J774, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Selma Giorgio (Dpto. de Biologia Animal -Unicamp).

O protocolo adotado foi o proposto por Lu *et al.* (1999), com algumas alterações conforme segue. A partir de uma garrafa de cultura de 25 cm^2 com macrófagos cultivados, foi feito o repique das células para uma garrafa de 75 cm^2, utilizando o meio RPMI (Cultilab®) com 10% de FBS (Cultilab®). A garrafa foi cultivada por 3 dias em estufa de cultura celular a 37 °C e 5% de CO_2. As células foram observadas em microscópio de luz invertida e contadas em câmara de Neubauer após adição de azul de Trypan 1:1 para contabilização apenas de células viáveis (esse procedimento foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Leonilda Maria B. Santos, que gentilmente cedeu o espaço).

As culturas bacterianas foram cultivadas em 5 mL de LB e no dia seguinte uma alíquota na proporção de volume 1:100 foi adicionada a 50 mL de LB fresco. As novas culturas foram mantidas a 37 °C e 150 rpm durante 3 horas, para obtenção aproximada do título aproximado de 10^8 $UFC.mL^{-1}$ (confirmado por plaqueamento e contagem no dia seguinte). Foram adicionados 100 µL de bactéria por poço e a placa foi submetida a uma breve centrifugação por 5 segundos a 1000 rpm (Rotor F-34-6-38, Centrifuge 5804R Eppendorf®) para garantir o contato entre as bactérias e o tapete de macrófagos. As placas foram mantidas na estufa por 1 hora para a ocorrência de

fagocitose e invasão intramacrofágica. Após esse período, o antibiótico gentamicina foi adicionado para uma concentração final de 50 μg/mL (Shering-Plough®), a fim de matar as bactérias extracelulares e impedir que as mesmas influenciassem na contagem das bactérias presentes no interior dos macrófagos.

Nos tempos 0, 3 e 6 horas após a adição da gentamicina, o surfactante Triton X-100 (BIO-RAD®) foi adicionado para lisar as células e o conteúdo resultante foi plaqueado em LA para determinação da densidade bacteriana no dia seguinte, pelo método de plaqueamento e contagem (Barbosa *et al*., 1995).

4.4.6. Resistência a Intermediários Reativos de Oxigênio (ROI)

A virulência de *S. enterica* Typhimurium está relacionada à resistência à morte por espécies reativas de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI), uma vez que fagócitos controlam o crescimento de *Salmonella* utilizando ROI gerado via NADPH-oxidase e RNI via iNOS (óxido nítrico sintetase) (Lu *et al*., 1999; Mastroeni *et al.*, 2001). Para avaliar a susceptibilidade das linhagens estudadas a ROI e RNI ensaios foram executados conforme descrito neste tópico e no tópico seguir (4.4.7.).

A substância metil-viologen (MV), também denominada paraquat ou "N,N'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride", é um composto quaternário de amônio, hidrofílico e carregado, capaz de participar do ciclo redox, que gera radicais livres derivados do oxigênio no interior de células bacterianas, sob condições aeróbicas de crescimento (Santiviago *et al*, 2002).

Dessa forma, para testar a sensibilidade das linhagens de *Salmonella* a ROI, primeiramente foi adotado o método clássico de difusão em disco proposto por De Groote *et al.* (1996). No entanto, mesmo as linhagens selvagens apresentaram sensibilidade ao MV e por isso foi aplicado um protocolo experimental com modificações, proposto por Santiviago *et al.* (2002), conforme explanado a seguir.

As linhagens a serem testadas foram cultivadas durante a noite a 37 °C em meio mínimo (M9) e no dia seguinte 300 μL das culturas puras ou diluídas 10 vezes em PBS (pH 7,4) foram espalhadas sobre placas de LA. Aguardou-se um período para secagem das placas e discos de papel filtro (LB LaborClean®) contendo 10 μL de MV (Acros Organics®) a 10 mM foram cuidadosamente depositados no centro das mesmas. As placas foram incubadas durante a noite para determinação das zonas inibitórias no dia seguinte. O diâmetro dos halos de inibição foi determinado em mm, considerando a média aritmética de duas medidas, ambas com o eixo

passando pelo centro do disco de difusão.

4.4.7. Resistência a Intermediários Reativos de Nitrogênio (RNI)

Para determinar a resistência das linhagens a intermediários reativos de nitrogênio foi utilizado o meio acidificado ASN, já que o nitrito de sódio ($NaNO_2$) gera RNI, incluindo ácido nitroso (HNO_2) e óxido nítrico (NO) em meio ácido (Lu *et al*., 1999).

Dessa forma, as linhagens testadas foram cultivadas durante a noite em 2 mL de LB e 20 µL das culturas em fase estacionária foram adicionados a 2 mL de LB pH 5 contendo 15 µM de nitrito de sódio (LABSYNTH®) e 2 mL de LB pH 5 sem nitrito de sódio (controle). As culturas foram incubadas a 150 rpm e amostras foram coletadas nos tempos 0, 3 e 6 horas. As amostras foram diluídas em PBS (pH 7,4) e plaqueadas em triplicata sobre LA para determinação da $UFC.mL^{-1}$ por contagem no dia seguinte (Barbosa *et al*., 1995). A capacidade de sobrevivência das linhagens nessas condições foi analisada por comparação da UFC entre as culturas controle e com nitrito de sódio.

4.5. Análise *in vivo* da atenuação das linhagens recombinantes

A caracterização da virulência *in vivo* das linhagens selvagens e mutantes foi realizada pela administração de inóculos via oral e intraperitoneal em camundongos fêmeas BALB/c com 6 a 8 semanas.

Para a realização dos ensaios, as linhagens de *S. enterica* foram cultivadas em 5 mL de LB sem agitação a 37 °C durante a noite. Em seguida, 500 µL de cada cultura foram transferidos para 50 mL de meio LB enriquecido com 2% de glicose. As novas culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação constante (150 rpm) durante o período apropriado para cada linhagem, visando atingir a fase log de crescimento. Posteriormente, as células foram sedimentadas por centrifugação (10000 rpm por 15 minutos a 4 °C) e lavadas com tampão PBS (pH 7,4). Diluições seriadas foram plaqueadas em triplicata sobre LA para determinação da $UFC.mL^{-1}$ no dia seguinte.

Os grupos de camundongos (n=3) foram inoculados via intraperitoneal com seringas descartáveis contendo 100 µL das suspensões bacterianas com títulos variando entre 10^2 e 10^5 UFC, ou via intragástrica utilizando agulhas de gavagem (modelo IC800, INSIGHT®, Ribeirão Preto-SP, Brasil) com 100 µL das linhagens contendo títulos variando de 10^2 a 10^9 UFC. Nos grupos infectados por via oral, os animais foram privados de água por 30 a 60 minutos antes e

depois da administração do inóculo. Os camundongos foram monitorados quanto à sobrevivência ao longo de 30 dias após a infecção.

A partir dos resultados obtidos por esses ensaios foi possível estabelecer a DL_{50} (Dose Letal Média) de cada linhagem e definir quais dariam prosseguimento aos ensaios de vacinação e desafio.

4.6. Proteção e Desafio

A capacidade de desencadear uma resposta imune contra *S. enterica* foi testada em dois momentos. No primeiro, os animais foram imunizados com uma única dose das linhagens recombinantes Δ*hha* e Δ*hupA*Δ*hupB* e então desafiados após 30 dias com a cepa virulenta de *S. enterica*. Em um segundo momento, os animais foram imunizados oralmente com duas suspensões da linhagem duplo mutante Δ*hupA*Δ*hupB* nos dias 0 e 14 e desafiados com a linhagem selvagem no 28° dia após a primeira dose. As culturas utilizadas para administração do inóculo foram cultivadas conforme descrito na seção anterior (4.5.). Os experimentos posteriores de desafio prosseguiram para a linhagem duplo mutante, já que esta apresentou os resultados mais promissores. A dose de imunização foi 10^7 ou 10^8 UFC e o desafio foi realizado 30 dias após a segunda vacinação, com doses de 10^6 ou 10^7 UFC da linhagem 662ST, correspondendo a uma dose 100 e 1000 vezes a DL_{50}, respectivamente.

Para estes experimentos foram utilizados grupos com 05 a 07 camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o desafio e avaliados quanto à sua sobrevivência.

4.7. Determinação da Dose Letal Média

Por meio dos resultados obtidos a partir da infecção de camundongos, a dose letal média (DL_{50}) foi calculada por meio de um "software" baseado no método MAI ("Moving Average Interpolation"), proposto por Welkos & O'Brien (1994).

4.8. Colonização e persistência em órgãos

Para verificar a colonização e persistência bacteriana nos órgãos dos camundongos um ensaio qualitativo, avaliando a ausência ou presença das bactérias ao longo do tempo, foi realizado. Para tal, 15 camundongos foram inoculados com 10^8 UFC da linhagem duplo recombinante

Δ*hupA*Δ*hupB* e 05 amostragens com 03 animais cada foram realizadas. Apenas a linhagem duplo recombinante foi selecionada para os ensaios de colonização, pois esta foi a que apresentou os melhores resultados de atenuação, imunização e proteção.

A presença de bactérias foi analisada no baço, placas de Peyer e sangue nos dias 03, 07, 10, 14 e 17 após a imunização. Nas referidas datas os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e seus órgãos foram assepticamente extraídos e homogeneizados (Omni Mixer Homogeneizer® 04728-00, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) em 1 mL de PBS (pH 7,4). O preparado puro e diluído em PBS (pH 7,4) em escala logarítmica foram plaqueados sobre MacConkey e incubados a 37 °C para verificação de colônias no dia seguinte.

4.9. Avaliação da resposta imune

A avaliação da resposta imune foi realizada somente para a linhagem 662ST Δ*hupA*Δ*hupB*, pois dentre as linhagens desenvolvidas a duplo mutante apresentou o melhor potencial vacinal, verificado pela atenuação e proteção no modelo murino. Para tal, 04 grupos de camundongos (n=5) foram imunizados com 2 doses (10^8 UFC) da linhagem duplo mutante e amostras de sangue e fezes foram coletadas regularmente, conforme explanado em detalhes nas seções 4.9.1. e 4.9.2.

4.9.1. Coleta e processamento do soro para detecção de anticorpos séricos

Grupos com 05 animais foram duplamente imunizados via oral com a linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* e nos dias 14, 21, 28 e 35 após a segunda imunização, um grupo foi selecionado para a coleta de 300 a 600 μL de sangue por punção retro-orbital com pipetas Pasteur esterilizadas (Corning®).

As amostras foram alocadas em tubos esterilizados e mantidas por 2 horas em banho-maria a 37 °C para a formação do coágulo e 1 a 2 horas a 4 °C para a retração do mesmo. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos (2000 rpm e 4 °C) e então o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para tubos esterilizados e identificados. O soro foi armazenado a -20 °C.

4.9.2. Coleta e processamento de material fecal para detecção de anticorpos de mucosa

A imunoglobulina A secretória é produzida por plasmócitos presentes na mucosa e após ser excretada por essas células, a IgA é transportada seletivamente através do epitélio da mucosa para o lúmen do órgão. A IgA exerce função antimicrobiana por meio da ligação com epitopos presentes em

microrganismos, que restringem sua mobilidade e/ou previnem sua ligação com o epitélio (Elia & Souza, 2001).

Para verificar a presença de anticorpos IgA, 04 grupos de animais (n=5) foram imunizados com 2 doses orais (10^8 UFC) da linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* e nos dias 14, 21, 28 e 35 após a segunda imunização, um grupo foi selecionado para a coleta de 04 pelotas fecais de cada animal foram coletadas em condições assépticas, compondo uma quantidade amostral suficiente para a detecção de anticorpos. As amostras fecais foram imediatamente transferidas para tubos contendo 1 mL de PBS com 1mM PMSF (Calbiochem®) 1% BSA (USB Corporation®) e incubadas durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, as amostras foram homogeneizadas em agitador (Daigger Vortex Genie 2®) e centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos (Eppendorf 5415R®). O sobrenadante foi transferido para tubos identificados e esterilizados e as amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.9.3. Preparo de antígenos brutos

A sensibilização das placas para os ensaios imunoenzimáticos foi realizada com antígenos brutos de *Salmonella*, conforme proposto por Fayolle *et al.* (1994).

A linhagem selvagem foi cultivada durante a noite em 500 mL de LB e no dia seguinte as células foram precipitadas por centrifugação (10000 rpm por 15 minutos) e recuperadas em 5 mL de PBS (pH 7,4) para atingir a concentração de ~10^{11} UFC.mL^{-1}. As amostras foram incubadas em banho-seco (Thermolyne®, USA) a 80 °C por 10 minutos para matar as bactérias e a suspensão foi armazenada a -20 °C.

4.9.4. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

4.9.4.1. Detecção de imunoglobulinas IgG anti-*Salmonella*

A sensibilização das placas (Greiner®, média afinidade) foi realizada pela adição de 100 µL de antígenos brutos de *Salmonella* por poço, preparados de acordo com a seção 4.9.3. Os antígenos brutos foram diluídos na proporção 1:100 em tampão carbonato (pH 9,6). A placa foi incubada por 2 horas a 37 °C ou a 4 °C durante a noite e posteriormente foi lavada 3 vezes com 200 µL por poço de PBS-T (0,05% Tween 20 Sigma-Aldrich®) utilizando-se a máquina de lavagem "Multiwash II" (TriContinent®). Em seguida, os poços foram bloqueados com 200 µL de PBS-T 1% BSA (USB Corporation®) e então a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C para a ligação da albumina onde não houve a adesão de antígenos. A placa foi novamente submetida à

lavagem como descrito anteriormente. O soro coletado dos animais, supostamente contendo o anticorpo primário, foi diluído em tampão de incubação (PBS-T 0,1% BSA) nas proporções 1:50, 1:100, 1:200 e assim sucessivamente. O soro foi adicionado no volume de 100 µL por poço e a placa foi incubada durante a noite a 4 °C. A primeira fileira da placa foi utilizada como controle branco, tendo sido tratada apenas com tampão de incubação e a segunda fileira foi utilizada como controle pré-imune, com amostras coletadas antes da imunização. Sempre que submetida a período de incubação, a placa foi protegida da luz.

No dia seguinte, a placa foi submetida à lavagem e 100 µL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase produzido em cabra (Sigma-Aldrich®) foi adicionado em cada poço. O anticorpo secundário foi diluído na proporção 1:2000 em tampão de incubação (PBS-T 0,1% BSA). A placa foi incubada por 2 horas a 37 °C e em seguida foi lavada. O substrato OPD 10 mg (Sigma-Aldrich) foi diluído em 25 mL de tampão fosfato-citrato (pH 5) com 10 µL de peróxido de hidrogênio e 100 µL dessa solução de coloração foram adicionados por poço. A reação de coloração não foi interrompida e leituras sequenciais da absorbância (450 nm) foram realizadas em espectrofotômetro (Biotek, Synergy 2®). Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, que gentilmente disponibilizou sua utilização.

4.9.4.2. Detecção de imunoglobulinas IgA anti-*Salmonella*

Para detecção dos anticorpos de mucosa IgA foi realizada uma tentativa conforme o protocolo descrito acima (seção 4.9.4.1.), utilizando anti-IgA conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich®). No entanto, não foi possível detectar imunoglobulinas IgA anti-*Salmonella* por meio desse protocolo. Dessa forma, decidimos adotar o método de ELISA sanduíche com anti-IgA biotinilado para amplificação do sinal, conforme descrito a seguir.

A sensibilização de placas de média afinidade (Greiner®) foi realizada por meio da adição de 100 µL por poço de antígenos brutos de *Salmonella*, como anteriormente descrito (seção 4.9.3.). A placa foi incubada a 4 °C durante a noite e posteriormente foi lavada 3 vezes com 200 µL por poço de PBS-T (0,05% Tween 20 Sigma-Aldrich®) utilizando a máquina de lavagem "Multiwash II" (TriContinent®). Em seguida, o bloqueio dos poços foi realizado com 200 µL de PBS-T 1% BSA (USB Corporation®) e então a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C para a adesão da albumina. A

placa foi novamente submetida à lavagem três vezes e 100 µL das amostras com material fecal processado diluídas em PBS-T 0,1% BSA nas proporções 1:3, 1:6, 1:12, 1:24 e assim por diante, foram adicionados aos poços. Controles branco, somente com o tampão, e pré-imune, com amostras coletadas anteriormente à imunização, foram utilizados. A placa foi incubada durante a noite a 4 °C e sempre que submetida a período de incubação, a mesma foi protegida da luz.

No dia seguinte, a placa foi lavada com PBS-T e então 100 µL do anticorpo secundário anti-IgA biotinilado de camundongo (cadeia-α específica) (AbCam®) diluído na proporção 1:1000 em PBS 0,025% Tween 20® 0,1% BSA foram adicionados por poço. A placa passou por incubação a 37 °C durante 2 horas e então foi novamente lavada. A enzima HRP ("HorseRadish Peroxidase") conjugada com streptoavidina (Vector Laboratories® Inc. Burligame CA) foi diluída na proporção 1:2000 em PBS 0,025% Tween 20® 0,1% BSA e 100 µL foram adicionados por poço. A placa foi novamente incubada a 37 °C durante 2 horas e então lavada três vezes com PBS-T. O substrato OPD 10 mg (Sigma-Aldrich) foi diluído em 25 mL de tampão fosfato-citrato (pH 5) com 10 µL de peróxido de hidrogênio e 100 µL dessa solução de coloração foram adicionados por poço. A reação de coloração não foi interrompida e leituras sequenciais da absorbância a um comprimento de onda de 450 nm foram realizadas em espectrofotômetro (Biotek, Synergy 2®). Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, que gentilmente disponibilizou sua utilização.

4.10. Determinação do título de anticorpos

Foram consideradas como significativas somente as leituras de amostras com absorbância três vezes superior ao pré-imune (controle).

4.11. Análises estatísticas

Os testes estatísticos "t" pareados de Student foram realizados por meio do "software" "OriginPro 8". A hipótese nula (H_0) proposta foi a de não haver diferença entre as médias dos dados comparados e a alternativa (H_1) de existir diferença significativa, tendo considerado o intervalo de confiança como 95% (p=0,05). Os gráficos, as médias aritméticas e o desvio padrão dos dados foram calculados e plotados por meio dos programas "Microsoft Office Excel 2007" ou "OriginPro 8".

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Construção e identificação das linhagens recombinantes

5.1.1. Construção do cassete de recombinação

Para a construção de linhagens recombinantes é necessário amplificar o cassete de recombinação por PCR. O cassete de recombinação é composto por uma região homóloga ao gene alvo e uma região de anelamento ao plasmídio pKD3, que atua como DNA molde na reação de PCR.

Para confirmar se o cassete de recombinação amplificou o fragmento de tamanho esperado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, conforme demonstrado na Figura 06.

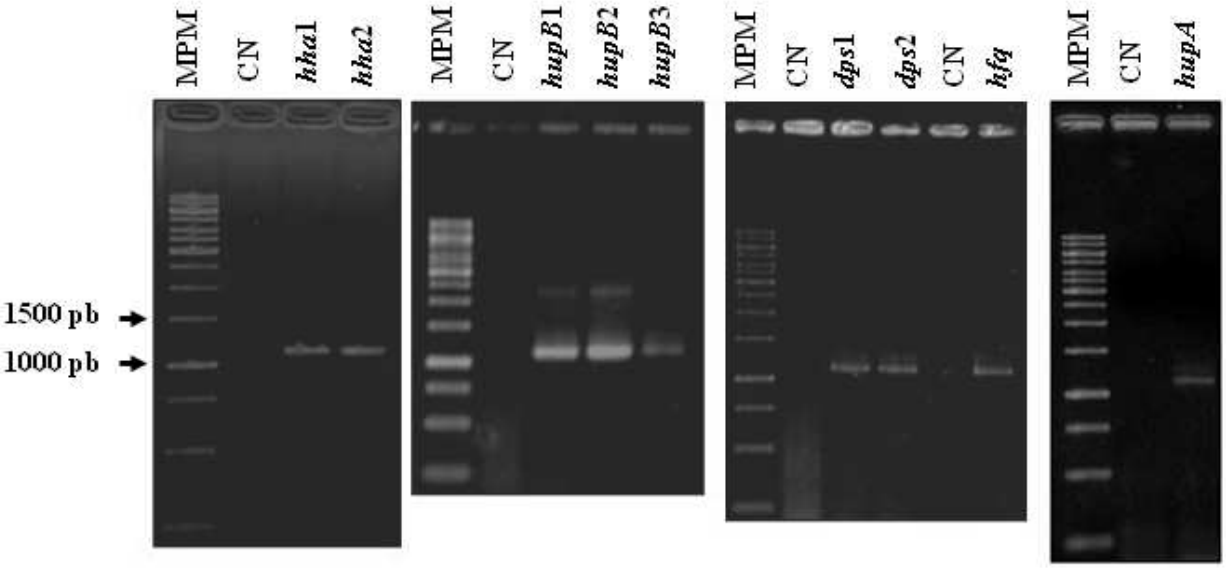


Figura 06. Cassetes de recombinação dos genes alvo para a construção das linhagens mutantes. Os fragmentos contêm cerca de 1200 pb, compreendendo o gene *cat* e regiões flanqueadoras compostas por sítios FRT ("FLP Recognition Targets") e regiões adjacentes ao gene alvo. Da esquerda para a direita, as amostras referem-se aos cassetes de recombinação dos genes *hha*, *hupB*, *dps*, *hfq* e *hupA*, respectivamente. No caso de *hupB* apenas a amostra 3 foi utilizada. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 kb DNA "ladder" (Fermentas®), CN: Controle Negativo (sem DNA).

As amostras selecionadas passaram por diálise em membranas com poros de 0,025 μm para

exclusão de tampão, resquícios de dNTPs e outros reagentes.

Para eliminar a possibilidade de inserção completa de plasmídios remanescentes no produto de PCR, o mesmo foi digerido com a enzima de restrição *DpnI* (Fermentas®). A enzima *DpnI*, isolada do microrganismo *Diplococcus pneumoniae*, cliva a sequência GA↓TC, mas apenas quando a adenina está metilada (representada pela seta para baixo). Como o produto de PCR não sofre metilação, é possível mantê-lo intacto, digerindo apenas sequências metiladas do plasmídio pKD3. Por meio desse procedimento, foi possível descartar a ocorrência de falsos positivos com inserção completa do plasmídio e colônias mistas, obtendo populações homogêneas com a substituição do gene alvo pelo gene *cat*.

Após esses procedimentos, os fragmentos de PCR foram empregados na eletroporação das linhagens 662ST/pKD46 ou 607STi/pKD46 para a obtenção de clones resistentes ao antibiótico cloranfenicol.

5.1.2. Confirmação da mutagênese

As colônias resistentes foram selecionadas por cultivo em placas de LA com cloranfenicol e reações de PCR com *primers* de detecção (tabela 03) foram realizadas para confirmar a substituição do gene alvo pelo gene *cat* (Figura 07). Após a confirmação, procedeu-se a transdução com o bacteriófago P22 e as colônias selecionadas foram novamente confirmadas por PCR.

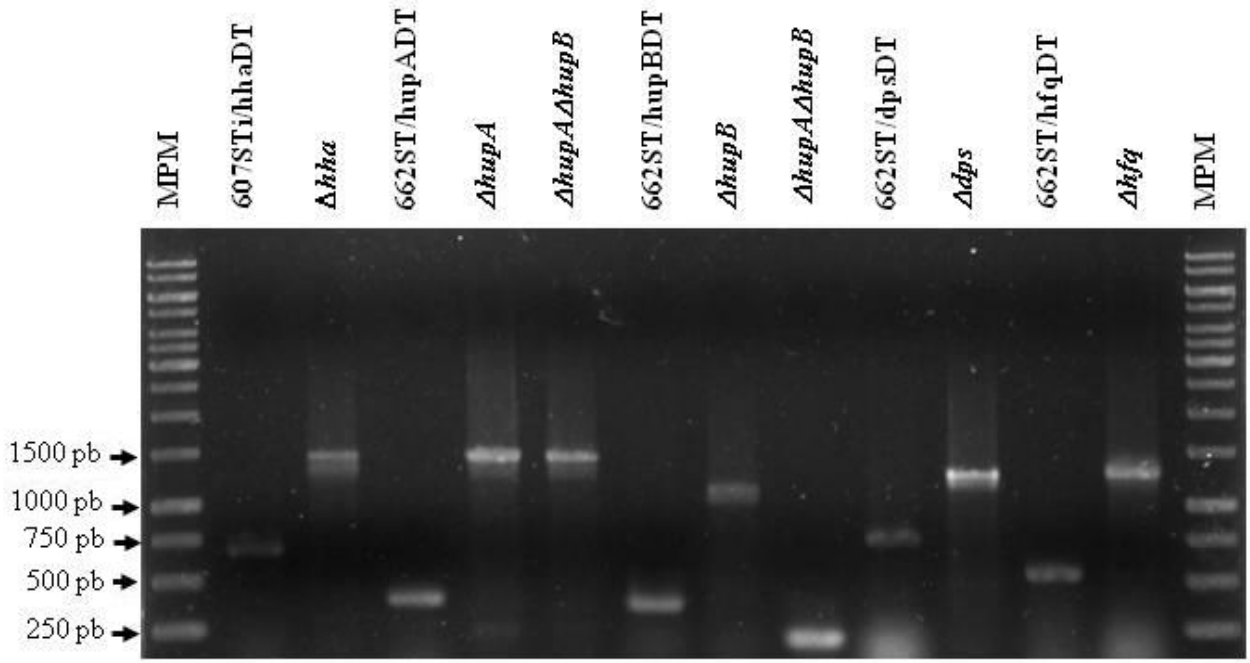


Figura 07. Confirmação por PCR das linhagens mutantes Δ*hha*, Δ*hupA*, Δ*hupB,* Δ*hupA*Δ*hupB*, Δ*dps* e Δ*hfq* de *S. enterica* após transdução com o fago P22. Gel de agarose 1% com os produtos de PCR utilizando respectivamente os *primers* de detecção *hha*DT, *hupA*DT1, *hupB*DT, *dps*DT, e *hfq*DT para confirmação da mutagênese. O controle positivo corresponde à linhagem selvagem 607STi ou 662ST com diferentes *primers*, como representado pela barra ao lado do nome da linhagem (Ex: poço 2: 607STi/hhaDT, representando que a linhagem selvagem 607STi foi amplificada pelo *primer* hhaDT). As linhagens selvagens apresentam fragmentos referentes ao gene íntegro e regiões flanqueadoras, de tamanhos 692 pb para *hha*, 396 pb para *hupA*, 371 pb para *hupB*, 731 pb para *dps* e 531 pb para *hfq*, enquanto os mutantes apresentam banda de 1.2-1.5 kb, equivalente ao gene *cat* e regiões flanqueadoras. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 kb DNA "ladder" (Fermentas®), CN: Controle Negativo (sem DNA).

5.1.3. Desenvolvimento da linhagem duplo mutante

Para a construção da linhagem duplo mutante 662ST*ΔhupAΔhupB* a primeira etapa foi a excisão do gene *cat* das linhagens Δ*hupA* e Δ*hupB*, para que uma delas agisse como receptora do gene seletivo na transdução. Para isso, células competentes de ambas as linhagens foram preparadas e eletroporadas com o plasmídio pCP20. A seleção foi feita em LA com ampicilina a 30 °C e as colônias crescidas foram posteriormente incubadas a 43 °C, devido à maquinaria de

replicação deste plasmídio ser termosensível. A excisão do gene de resistência ao cloranfenicol foi bem sucedida (Figura 08).

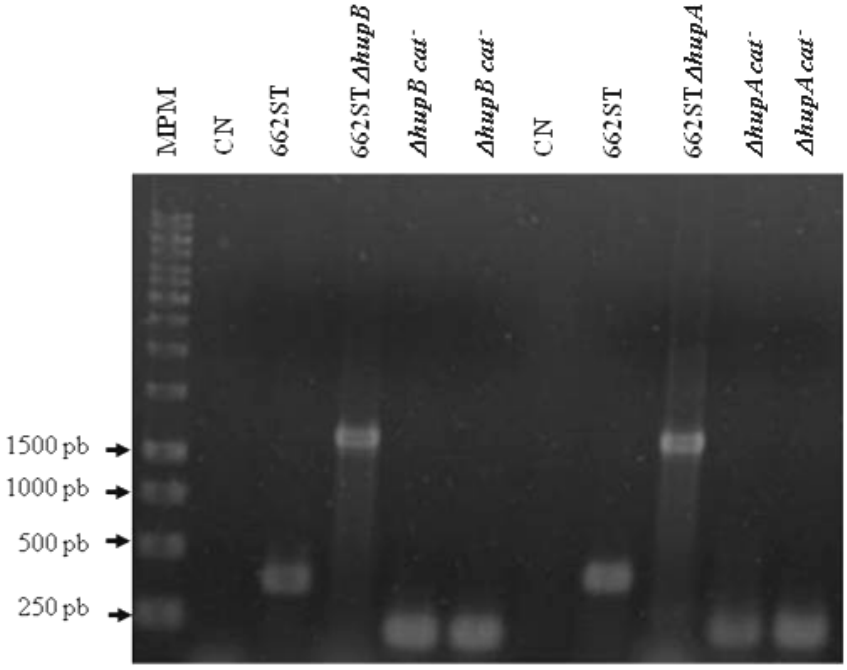


Figura 08. Eliminação do cassete de resistência ao cloranfenicol em mutantes Δ*hupA* e Δ*hupB* de *S. enterica* Typhimurium. Foram utilizados os *primers* hupADT1 para as linhagens mutantes Δ*hupA* e hupBDT para os mutantes Δ*hupB*. Na linhagem selvagem (662ST) o fragmento amplificado corresponde aos genes íntegros, com 396 pb para *hupA* (poço 8) e 371 pb para *hupB* (poço 3), enquanto que para os mutantes isolados 662STΔ*hupA* e 662STΔ*hupB* os fragmentos contém cerca de 1,2 kb (gene *cat*). Já as linhagens com excisão do gene *cat* apresentam um fragmento com cerca de 140-200 pb, correspondente à "cicatriz" (cerca de 80 pb) e regiões flanqueadoras ao gene alvo, amplificadas pelos *primers* de detecção. MPM: Marcador de peso molecular 1 kb DNA "ladder" (Fermentas®), CN: Controle negativo (sem DNA), cat$^-$: representa as linhagens sem o gene *cat*.

Para prosseguir na construção do duplo mutante a linhagem Δ*hupA* resistente ao cloranfenicol foi selecionada como doadora do gene *cat* na transdução e a linhagem Δ*hupB* cat$^-$ como receptora. Os resultados deste experimento estão descritos na figura 09.

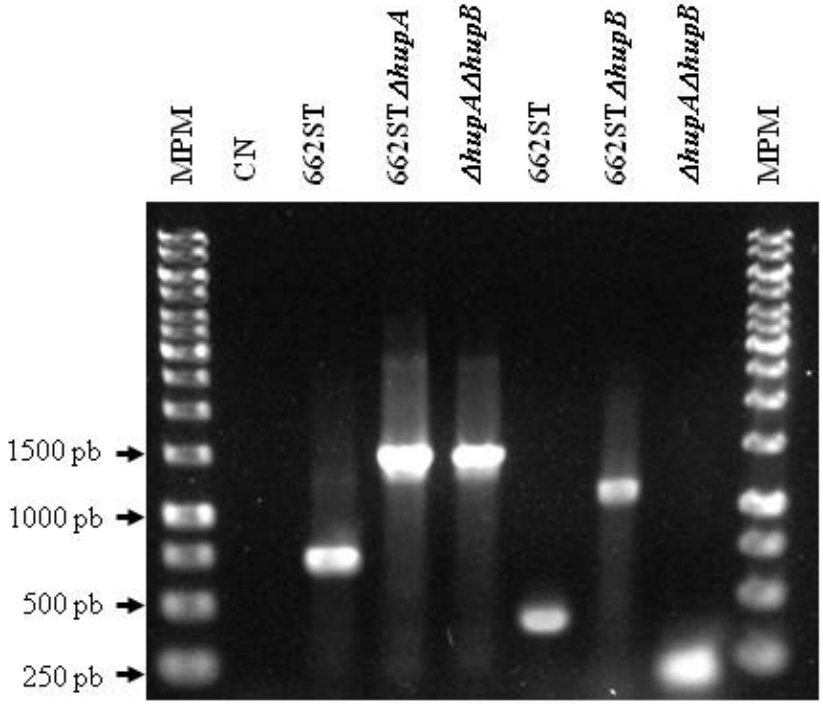


Figura 09. Construção da linhagem duplo mutante pelo nocaute do gene *hupB* e substituição do gene *hupA* pelo gene *cat*. Eletroforese em gel de agarose (1%) demonstrando os produtos de PCR realizados com os *primers* hupADT2 (poços 2 a 5) e hupBDT (6 a 8). Na linhagem selvagem (662ST) o fragmento amplificado corresponde aos genes íntegros, com 702 pb para *hupA* (poço 3) e 371 pb para *hupB* (poço 6), enquanto que para os mutantes isolados 662ST∆*hupA* e 662ST∆*hupB* os fragmentos contém cerca de 1,5 kb (poço 4) e 1,2 kb (poço 7), respectivamente, referentes ao gene *cat* e regiões flanqueadoras. Os fragmentos amplificados para o gene *hupA* são maiores do que no gel anterior, pois nesse momento foi utilizado o par de *primers* hupADT2, que abrangem regiões flanqueadoras mais externas ao gene *hupA* do que no caso anterior. Para a linhagem duplo mutante 662ST∆*hupA*∆*hupB*, a amplificação com os *primers* hupADT2 gerou um produto do mesmo tamanho do mutante isolado (poço 5), já que o gene *cat* foi mantido no lugar de *hupA*, enquanto que com os *primers* hupBDT, um fragmento menor foi amplificado (poço 8), correspondente à "cicatriz" composta pelos sítios FRT, após a eliminição do gene *cat* inserido no local de *hupB*. MPM: Marcador de peso molecular 1 kb DNA "ladder" (Fermentas®), CN: Controle negativo (sem DNA).

5.2. Caracterização das linhagens recombinantes

5.2.1. Sequenciamento de nucleotídeos

O sequenciamento de nucleotídeos foi realizado para as linhagens Δ*hupA*, Δ*hupB* e Δ*hupA*Δ*hupB*, que mostraram-se mais relevantes neste trabalho. Os resultados estão apresentados a seguir.

1) Duplo mutante Δ*hupA*Δ*hupB* sequenciado com o *primer* hupBDTf:

TCGTACTTCGAAGGATTCA**GGTGCGATATAAATTATAAAGAGGAAGAGAAGAGTGAATAAAGTGTAGG**
CTGGAGCTGCTTC*GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAA*CTAAGGAGGATATTCAT
ATGGCGGTAAACTAAGCG

A região destacada em rosa corresponde as sequências flanqueadoras ao gene *hupB* de *Salmonella*, seguidas por sequências do plasmídio pKD3, marcadas em verde. A região sublinhada equivale ao *primer* hupBDTf, onde o sequenciamento teve início. Em negrito está destacado o primer hupBf, utilizado na construção do cassete de recombinação, que abrange desde sequências de *Salmonella* (H1) até sequências do pKD3 (P1). A região plasmidial corresponde exatamente à cicatriz após excisão do gene *cat*, formada pelo "priming site 1" (P1), por sequências FRT (em itálico) e pelo "priming site 2" (P2). Após o término da cicatriz, foi possível detectar novamente sequências flanqueadoras ao gene *hupB* de *Salmonella*, que inclusive fazem parte do *primer* hupBr.

2) Duplo mutante Δ*hupA*Δ*hupB* sequenciado com o *primer* hupBDTr (sequência complementar e invertida):

TGTAGGCTGGAGCTGCTTC*GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAA***CTAAGGAGGA**
TATTCATATGGCGGTAAACTAAGCGTGATCCCCTCGGGGGATGTGACAAAGTACAAGGGCGCATCAA
C

Seguindo o mesmo padrão da sequência anterior em verde estão destacadas sequências presentes no pKD3, sendo que a região sequenciada corresponde exatamente ao P1, sítios FRT (em itálico) e P2, como sugerido no artigo que descreve o sistema de recombinação λRed (Datsenko & Wanner, 2000). A região marcada em rosa refere-se a sequências presentes em *Salmonella*, sendo que a região sublinhada corrresponde ao *primer* de detecção *hupB*DTr. As bases destacadas em

negrito equivalem ao *primer* hupBr (invertido e complementar) utilizado para a construção do cassete de recombinação e consequente recombinação homóloga.

3) Sobreposição do sequenciamento do duplo mutante Δ*hupA*Δ*hupB* com os *primers* hupBDT "forward" e "reverse":

TCGTACTTCGAAGGATTCA**GGTGCGATATAAATTATAAAGAGGAAGAGAAGAGTGAATAAAGTGTAGG**
CTGGAGCTGCTTC*GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAA***CTAAGGAGGATATTC**
ATATGGCGGTAAACTAAGCGTGATCCCCTCGGGGGATGTGACAAAGTACAAGGGCGCATCAAC

A sobreposição das bases sequenciadas a partir dos *primers* hupBDT f e r (sublinhados) condizem a regiões flanqueadoras do gene *hupB*, não mais existente na linhagem duplo recombinante Δ*hupA*Δ*hupB*, conforme confirmado pela presença de uma cicatriz do plasmídio pKD3 no lugar desse gene.

4) Duplo mutante Δ*hupA*Δ*hupB* sequenciado com *primer* hupADT2f:

GGCTCAGGGCAGACCTGCGCGAGGCTGGCGAGAGCA-TATCGGTATAAATTTTCAGCAATGACACCAGAAAACGTGAT
TTACGTCTGATTTGTCGTGCCATAAGGCTTCCCTTATGCCCCCCGTCTGGTCTACATTTGGGAGGC-AAAAAAAGTGGCT
ATCGGTGCGTGTATGCAGGAGAGTGCTTTTCTGGCATTTCC-TCGCACTC-ATGCT**TAGCAAGCGATAAACACATTGTA**
AGGATAACTTATGAACAAG**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC**GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGA
ATAGGAACTTCATTTAAATGGCGCGCCTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTC
TGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTAT
AATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAACTCA
CCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACG
CCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGT
TTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGTAATT
CCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAGATG-GAATAA-GCCG-ATAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGTCTTAAAAGGC
GTATATCA

Neste caso as sequências são maiores, pois no local do gene *hupA* foi inserido o gene *cat* e regiões plasmidiais flanqueadoras (~1,2 kb). Em rosa, está destacada a sequência correspondente à região flanqueadora ao gene *hupA* de *Salmonella*, que logo em seguida é interrompida por sequências presentes no plasmídio pKD3, demonstradas em verde, correspondentes ao P1 e ao gene *cat*. Em negrito está destacado o *primer* hupAf, utilizado para construção do cassete de recombinação. Os traços simbolizam bases não identificadas no sequenciamento.

5) Duplo recombinante Δ*hupA*Δ*hupB* sequenciado com o *primer* hupADT2r (sequência complementar e invertida):

CAAACCCTTTAGG-AAATAGGCCAGGTTT-CACCGTAACACG--ACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGGAAAT
CGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTAT
CCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGTAATTCCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATA
AAGGCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATA
GGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAG
TGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTT
CATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGT
ATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCTGTC-CAGGTAGGCGCGCCGAAGTTCCTATAC

Nesse sequenciamento foram detectadas apenas bases referentes ao plasmídio pKD3, já que o início e o final da sequência apresentaram baixa qualidade no eletroferograma e por isso foram desconsideradas. As regiões de alinhamento com o plasmídio correspondem a uma região do gene *cat* (nucleotídeos 263 a 993 do plasmídio). Os traços simbolizam bases não identificadas no sequenciamento.

6) Sobreposição do sequenciamento da linhagem Δ*hupA* com os *primers hupA*DT2 "forward" e "reverse":

GGGCAACCTGCGCGAGGCTGGCGAGAGCAATATCGGTATAAATTTTCAGCAATGACACCAGAAAACGTGATTTAAC
GTCTGATTTGTCGTGCCATAAGGCTTCCCTTATGCCCCCCGTCTGGTCTACATTTGGGAGGCGAAAAAAAGTGGCTAT
CGGTGCGTGTATGCAGGAGAGTGCTTTTCTGGCATTTCCGTCGCACTCATGCT**TAGCAAGCGATAAACACATTGTAA**
GGATAACTTATGAACAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGA
ATAGGAACTTCATTTAAATGGCGCGCCTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCAT
TCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCG
TATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAA
CTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCACC-GTA
ACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACG
TTTTCAGTTTGCTCATGG-AAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTT-CATTGC
CATACGTAATTCCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTT
TCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTAAATGC
CTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCC
TTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCT
CTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTT
ATTTATTCTGCGAAGTGATCTTC-GTCACAGGTAGGCGCGCCGAAGTTCCTATACT

Em rosa, está destacada a sequência correspondente à região flanqueadora ao gene *hupA* de *Salmonella*, que em seguida é descontinuada por sequências presentes no plasmídio pKD3, correspondentes ao P1 e ao gene *cat*. Em negrito está destacado o *primer* hupAf, utilizado para construção do cassete de recombinação. Os traços simbolizam bases não identificadas no sequenciamento. Notar que o sequenciamento da linhagem Δ*hupA* é compatível com o obtido para Δ*hupA*Δ*hupB*, uma vez que ambas as linhagens portam a mesma mutação na região sequenciada.

7) Sobreposição do sequenciamento da linhagem Δ*hupB* com os *primers hupB*DT "forward" e "reverse":

GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAC-TCGGAATAGGAACTTCATTTAAA-GG
CGCGCCTTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTG-ATTCATTAAGCATCTGCCGACATGGAAGCCATCACAA
ACGG-ATG-GAACCTGAATC--C-G--G-A-CA-CACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCG
AAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATA
TTCTCAATAAACCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACT
GCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGT
GAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTT-ATTGCCATACGTAATTCCGGATGAGC-TTCATCAGGCGG-CAAGAA
TGTGAATAAAGGCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTC
TGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGT
ATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGACAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTG
ATCTTATTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACCTCTTACGWGMCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGG
CTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTAGGCGCGCCGAAGTT
CCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAAC**TAAGGAGGATATTCATATG**G

Nesse sequenciamento foram detectadas apenas bases presentes no plasmídio pKD3, já que o início e o final da sequência apresentaram baixa qualidade no eletroferograma e por isso foram descartadas. As sequências abrangem os sítios de anelamento P1 e P2, destacados em negrito no início e no final do sequenciamento, respectivamente.

Os resultados apresentados confirmam a deleção dos genes *hupA* e/ou *hupB* nos mutantes de *S. enterica*.

5.2.2. Confirmação da presença de genes de virulência

Para obter linhagens recombinantes, é necessária a manipulação do material genético bacteriano. Para detectar se esse processo gerou mudanças indesejáveis no DNA das linhagens, selecionamos dois genes essenciais à patogenicidade de *Salmonella*, para comparação com as linhagens selvagens originais.

Conforme demonstram as figuras 10 e 11 vemos que os processos de eletroporação e transdução não acarretaram em mudanças estruturais em genes não relacionados ao gene alvo, sendo eles *invE* e *spvC*.

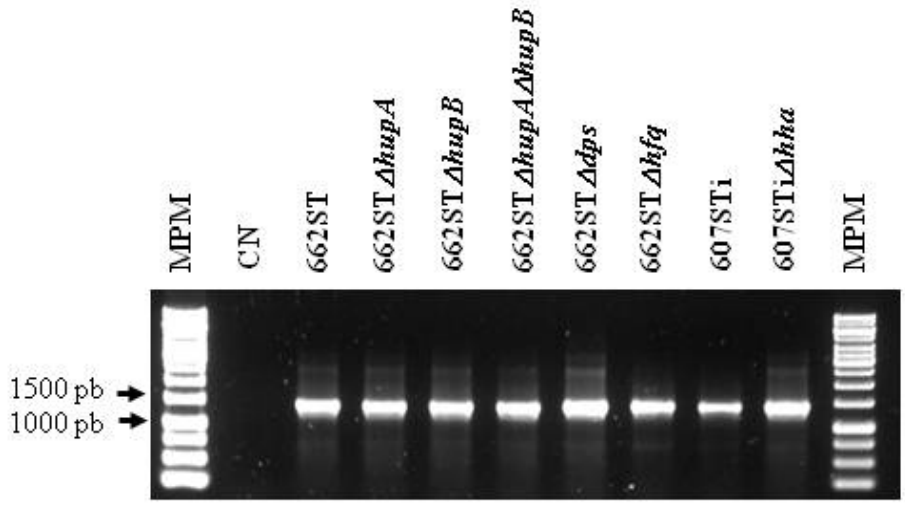


Figura 10. Detecção do gene de invasão *invE*, essencial à patogenicidade de *Salmonella*. As linhagens recombinantes mantiveram esse gene intacto em relação à selvagem, mesmo após as etapas de transformação. MPM: Marcador de peso molecular 1 kb DNA "ladder" (Fermentas®), CN: Controle negativo (sem DNA).

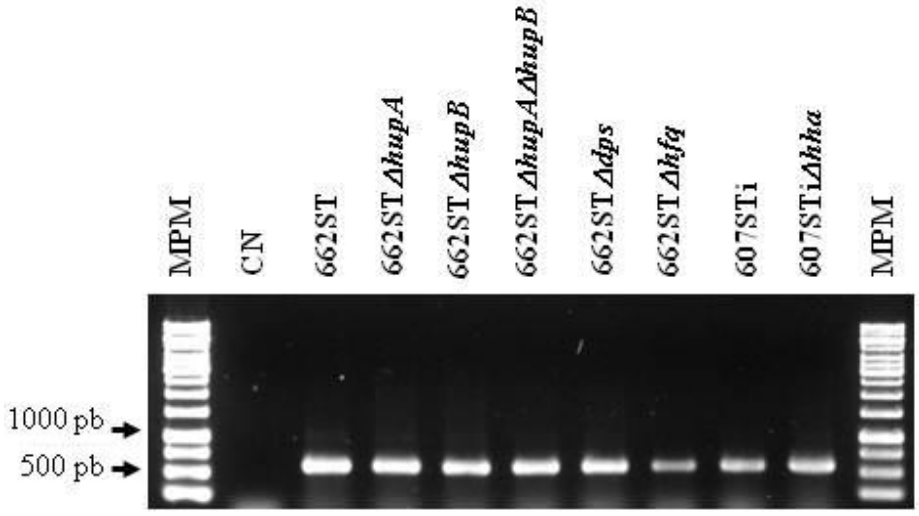


Figura 11. Detecção do gene de virulência *spvC* do plasmídio de virulência pSLT, presente tanto nas linhagens selvagens quanto nas recombinantes. MPM: Marcador de peso molecular 1 kb DNA "ladder" (Fermentas®), CN: Controle negativo (sem DNA).

5.2.3. Teste de aglutinação em lâmina

O teste sorológico faz uso de antígenos flagelares e somáticos específicos de *Salmonella,* conforme descrito na seção 4.4.3. As linhagens selvagens e recombinantes de *S. enterica* foram

testadas e apresentaram aglutinação sobre lâmina, confirmando sua identidade por esse teste. Já a linhagem *E.coli* BL21(DE3), utilizada como controle negativo, não apresentou aglutinação (dados não mostrados).

5.2.4. Curva de crescimento *in vitro*

A caracterização do crescimento das linhagens é importante não só por revelar o comportamento *in vitro* das bactérias em um sistema fechado, mas também por permitir estabelecer uma relação entre tempo e densidade populacional, essencial para diversos experimentos, como a inoculação *in vivo*.

A caracterização do crescimento das linhagens selecionadas foi realizada conforme explanado na seção 4.4.4. As curvas foram padronizadas fixando as condições de crescimento das culturas em meio LB enriquecido com 2% glicose, sob agitação constante a 150 rpm e 37 °C.

Embora as linhagens comparadas, dispostas nos gráficos a seguir (figuras 12 a 16), tenham apresentado diferença no crescimento, essa diferença não é significativa do ponto de vista estatístico. Os testes estatísticos *t* de Student foram realizados por meio do "software" OriginPro 8.

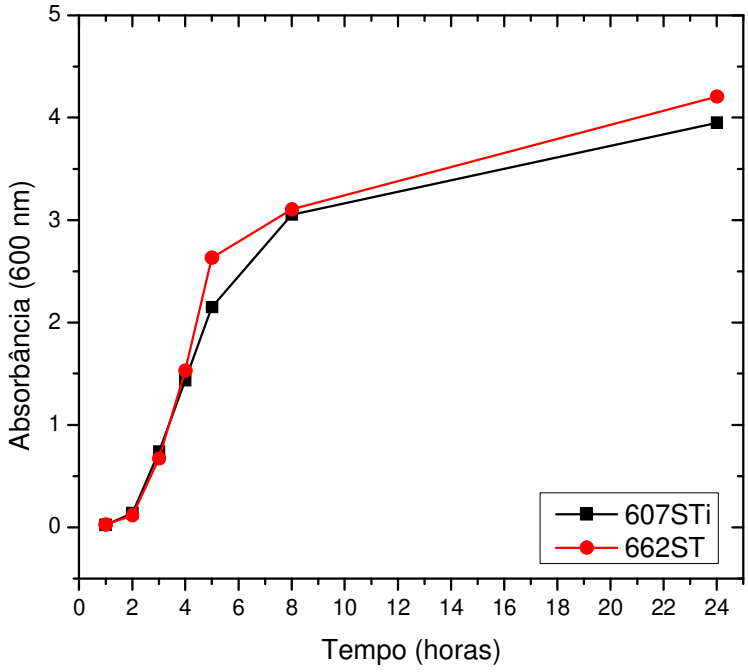


Figura 12. Caracterização prévia do crescimento das linhagens selvagens 607STi (quadrados pretos) e 662ST (esferas vermelhas), estabelecendo uma relação entre a absorbância (DO_{600nm}) e o

tempo. Apenas neste caso as culturas foram cultivadas em meio LB sem glicose.

O crescimento observado para as linhagens selvagens indica que as mesmas possuem uma fase *lag* até cerca de 2 horas de cultivo e após este período iniciam a fase *log*, apresentando um crescimento exponencial até aproximadamente 5 horas. A partir desse momento, observamos uma tendência da cultura em entrar na fase estacionária, que se mantém mesmo após 24 horas de cultivo (Figura 12).

Comparando-se os resultados obtidos com a linhagem 607STi e o mutante 607STiΔ*hha*, observamos um retardo do crescimento da linhagem mutante (Figura 13). O mesmo não foi verificado quando a linhagem 662ST foi comparada ao mutante 662STΔ*dps* (Figura 14). Por outro lado, o mutante 662STΔ*hfq* apresentou uma fase *lag* muito mais longa do que a linhagem selvagem (Figura 15), observação esta relatada previamente por Sittka *et al*. (2007). É possível afirmar que se trata de uma fase *lag*, pois foi realizada a contagem de células após 24 horas de cultivo, verificando que houve aumento da densidade populacional, atingindo 10^8 UFC.mL^{-1} (dados não mostrados).

Não investigamos tais linhagens em maiores detalhes, uma vez que o nível de atenuação desses mutantes não foi apropriado para uso como linhagens vacinais (vide seções 5.3.1. e 5.3.2.).

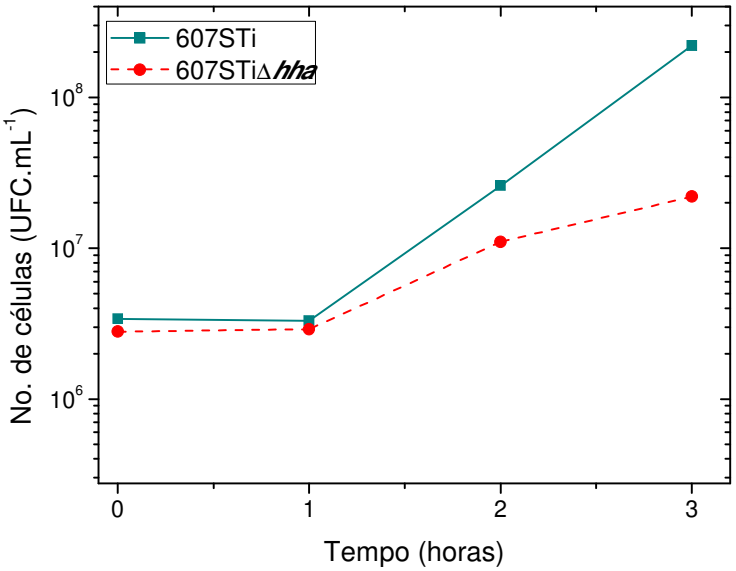


Figura 13. Comparação do padrão de crescimento *in vitro* das linhagens selvagem 607STi (linha contínua) e recombinante 607STiΔ*hha* (linha tracejada). A linhagem mutante apresentou uma

pequena, mas não significativa, diferença no crescimento em relação à selvagem após o período de adaptação de 1 hora.

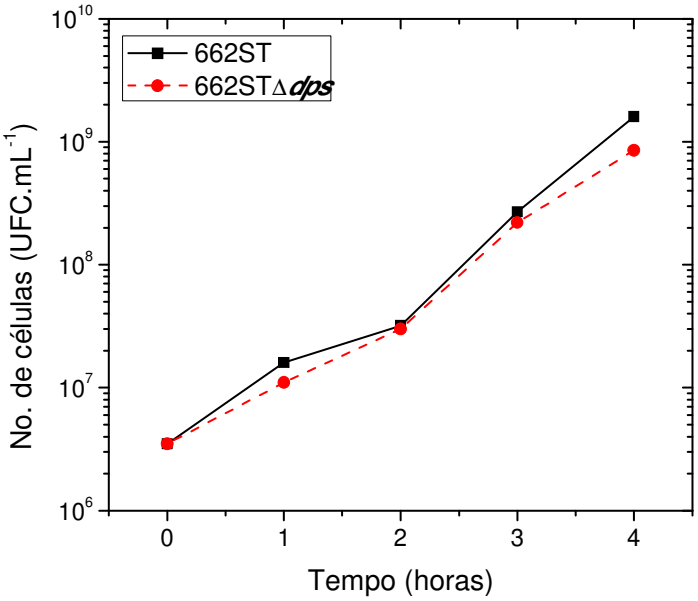


Figura 14. Curva de crescimento *in vitro* das linhagens selvagem 662ST (linha contínua) e mutante 662STΔ*dps* (linha tracejada). Não foram detectadas diferenças relevantes entre o padrão de crescimento dessas linhagens.

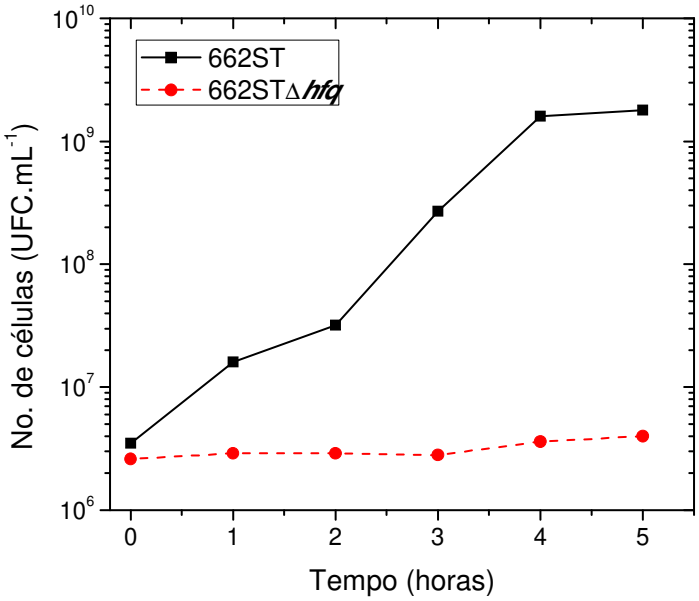


Figura 15. Curva de crescimento da linhagem mutante 662STΔ*hfq* (linha tracejada) em comparação à selvagem 662ST (linha contínua). Para os tempos testados, a linhagem recombinante

permaneceu na fase *lag* por um longo período, indicando que a deleção do gene *hfq* interfere no metabolismo bacteriano.

Quando as curvas de crescimento dos mutantes para a proteína HU foram avaliadas e comparadas com a da linhagem selvagem 662ST, todas apresentaram uma fase *lag* mais prolongada, sejam mutantes nulos para o gene *hupA* e/ou *hupB*. De fato, o duplo mutante apresentou uma delonga maior crescimento (Figura 16). Os dados aqui apresentados corroboram os descritos por Bi e colaboradores (2009), que haviam demonstrado um leve atraso no crescimento da linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* de *E.coli* em LB pH 7,5 quando comparada as linhagens selvagem e mutantes Δ*hupA* e Δ*hupB*. Nesse estudo também foram avaliadas diferenças de crescimento entre essas linhagens no meio EG (meio mínimo contendo uracila, timina e glicose) a diferentes pHs, verificando que o retardo no crescimento do duplo mutante é maior em meios ácidos (pH 4,6; 4,8 e 5), também com uma fase *lag* de crescimento mais prolongada. De qualquer forma, o crescimento mais lento não compromete a capacidade dos mutantes em atingir a fase *log* e estacionária de crescimento.

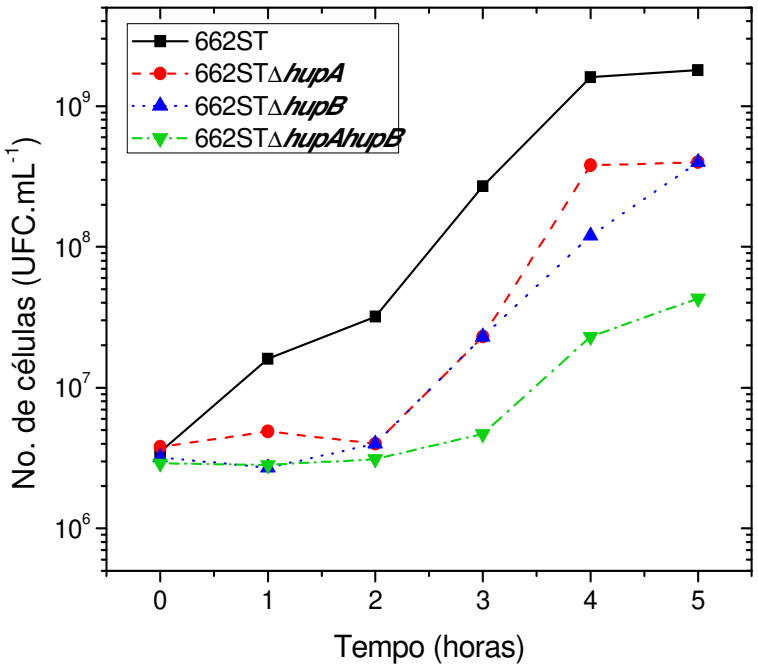


Figura 16. Curva de crescimento *in vitro* dos mutantes HU (linhas descontínuas) em relação à linhagem selvagem (linha contínua). A curva exibida pelo duplo mutante 662STΔ*hupA*Δ*hupB* (triângulos verdes invertidos) apresentou uma taxa de crescimento menor em relação as demais

linhagens. No entanto, essa diferença não compromete a capacidade de atingir a fase *log* de crescimento.

5.2.5. Invasão e multiplicação no interior de macrófagos

As linhagens recombinantes desenvolvidas no projeto foram avaliadas quanto à capacidade de invadir e sobreviver no interior de macrófagos da linhagem celular J774. Os dados obtidos demonstraram não existir diferenças significativas entre as taxas de invasão e sobrevivência apresentadas pelas linhagens selvagens e mutantes (Figuras 17 e 18).

O título de cada linhagem bacteriana foi de 10^7 bactérias por poço, no qual havia aproximadamente 10^5 macrófagos, gerando uma Multiplicidade de infecção (MOI) de 100 bactérias para cada macrófago. As exceções foram as linhagens Δ*dps* e Δ*hupA*, pois essas foram inoculadas com 1 log acima das demais linhagens (10^8 UFC), atingindo uma MOI equivalente a 1000 bactérias por macrófago. Nos gráficos observamos um valor 1 log acima do descrito, pois a unidade do eixo y considera a UFC presente em 1 mL e no ensaio foram inoculados 100 μL de cada linhagem por poço (Figuras 17 e 18).

As culturas foram incubadas durante 1 hora a ocorrência de fagocitose e invasão e após esse período, o antibiótico gentamicina (50 μg/mL) foi adicionado ao meio para matar as bactérias extracelulares, considerando para contabilização apenas as bactérias presentes no interior dos macrófagos.

A figura 17 apresenta os resultados obtidos para a linhagem selvagem de *S. enterica* 662ST, em conjunto com os mutantes HU. Nesse ensaio, foi possível verificar que os mutantes nulos para os genes *hupA* e *hupB* apresentaram comportamentos distintos. Enquanto a linhagem 662ST Δ*hupA* evidenciou uma tendência de sobrevivência e multiplicação intramacrofágica para os tempos testados, a linhagem 662ST Δ*hupB* indicou um menor grau de resistência.

Embora a quantidade de bactérias Δ*hupA*Δ*hupB* fagocitadas ou que tenham invadido macrófagos tenha sido inferior as demais (tempo 1 hora), ainda assim essa linhagem foi capaz não só de sobreviver, mas também de se replicar no interior de Mϕ, atingindo a mesma densidade populacional que a linhagem selvagem após 7 horas de ensaio, indicando que a deleção de ambos os genes *hupA* e *hupB* não acarretou problemas de sobrevivência e/ou multiplicação no interior de macrófagos J774 (Figura 17).

A Figura 18 apresenta os resultados de invasão da cultura de macrófagos J774 obtidos para as linhagens selvagens 662ST e 607STi e para os mutantes 662ST∆*dps*, 662ST∆*hfq* e 607STi∆*hha*. Das linhagens testadas nesse ensaio, 662ST∆*dps* apresentou resultados animadores, não por considerarmos a densidade absoluta quantificada, já que a quantidade inicial de bactérias foi maior, mas sim pela tendência de multiplicação intramacrofágica com o passar do tempo.

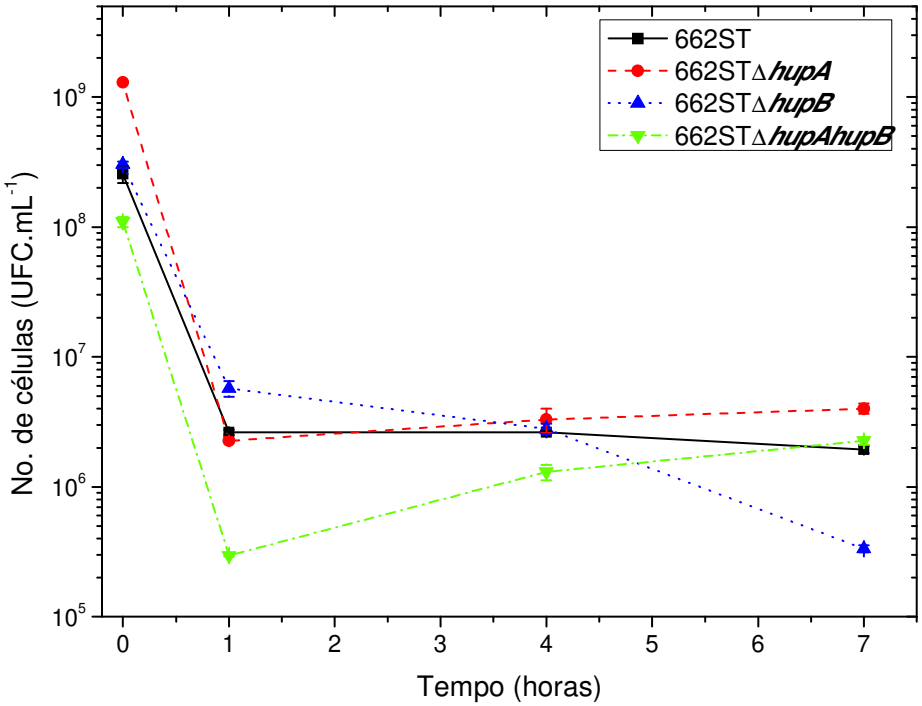


Figura 17. Invasão e sobrevivência intramacrofágica exibidas pela linhagem selvagem de *S. enterica* 662ST (linhas contínuas) e respectivos mutantes HU (linhas descontínuas). No tempo 0 está representada a quantidade de bactérias introduzidas na placa, que corresponde a 1 log a menos do indicado, já que foram utilizados 100 µL das culturas bacterianas para cada tratamento e o eixo y considera a quantidade de bactérias presente em 1 mL. A taxa de sobrevivência é considerada a partir do tempo 1 hora, pois esse foi o período de incubação para a fagocitose. Nos tempos 1, 4 e 7 horas os macrófagos foram lisados e o sobrenadante foi plaqueado em triplicata sobre LA para a determinação da UFC bacteriana. Uma parcela considerável das bactérias inoculadas no tempo 0 não foram recuperadas após 1 hora, indicando que nem todas elas foram fagocitadas ou realizaram a invasão dos macrófagos dentro desse período. As barras indicam o desvio padrão oriundo das triplicatas realizadas. A ausência da barra em alguns pontos é devido à uniformidade entre as triplicatas para o ponto amostral em questão, gerando um desvio padrão insignificante.

A deleção do gene *hfq* resulta na redução da invasão de macrófagos quando comparada à linhagem selvagem e a incapacidade de multiplicação no interior de macrófagos para os tempos testados (figura 18), resultados compatíveis com os já apontados por Sittka *et al.* (2007). Embora no ensaio realizado neste trabalho a tendência indique a inabilidade da linhagem 662STΔ*hfq* em sobreviver no interior de macrófagos com o passar do tempo, Sittka *et al*. (2007) constataram que após 24 horas as bactérias Δ*hfq* ainda podem ser encontradas no interior de macrófagos, mesmo na ausência de multiplicação. Devido a isso, Sittka e colaboradores (2007) concluíram que a deleção do gene *hfq* não afeta a expressão de genes relacionados à sobrevivência no interior de macrófagos, mas sim promove um efeito na expressão de genes da SPI-2, requeridos para a proliferação intracelular.

Em relação à linhagem 607STiΔ*hha*, foi observado que há uma tendência de diminuição da densidade bacteriana no interior dos macrófagos ao longo do tempo. No entanto, mesmo a linhagem selvagem 607STi apresentou uma capacidade limitada de sobreviver no interior de macrófagos por um período prolongado (Figura 18).

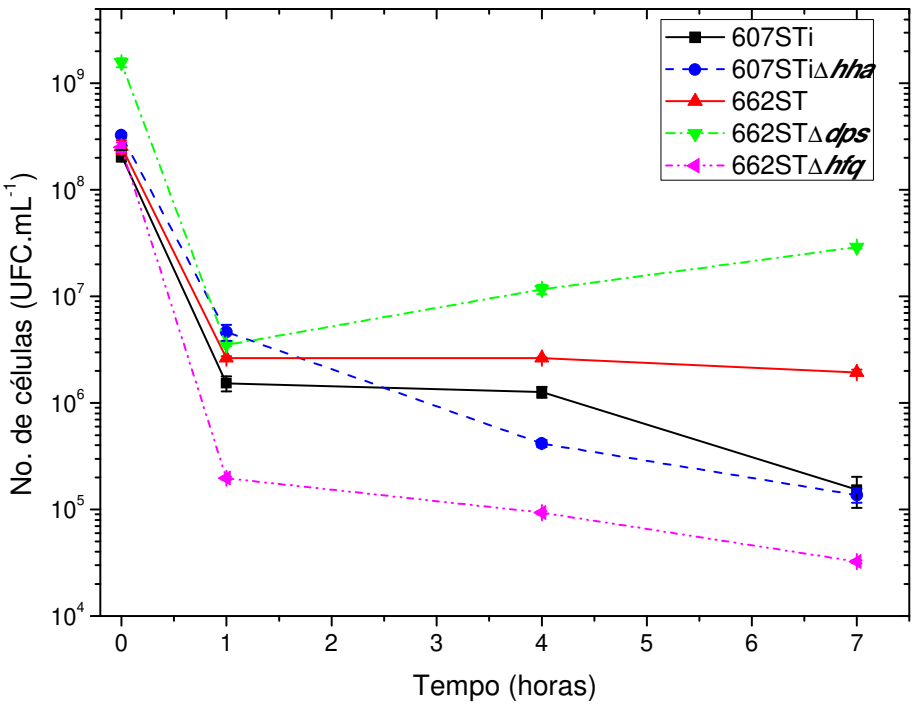


Figura 18. Ensaio de invasão e multiplicação das linhagens selvagens 607STi e 662ST (linhas contínuas) e recombinantes 662STΔ*dps*, 662STΔ*hfq* e 607STiΔ*hha* (linhas descontínuas) no interior de macrófagos da linhagem J774. As barras indicam o desvio padrão oriundo das

triplicatas realizadas. A ausência da barra em alguns pontos é devido à falta de variação entre as triplicatas para o ponto amostral em questão.

Uma observação interessante é que dentre os mutantes testados, as linhagens 662ST Δ*hupA*, 662ST Δ*dps* e principalmente 662ST Δ*hupA* Δ*hupB* apresentaram os melhores resultados, pois foram capazes de sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos, características essenciais para a indução do sistema imune do hospedeiro a nível sistêmico.

5.2.6. Resistência a Intermediários Reativos de Oxigênio (ROI)

Todas as linhagens desenvolvidas neste trabalho foram testadas quanto à capacidade de resistir a intermediários reativos de oxigênio, característica essa importante na virulência de *Salmonella*. Verificou-se que para as diluições testadas, apresentadas na tabela 05, as linhagens 662ST, Δ*dps*, Δ*hupA*, Δ*hupB* e Δ*hupA*Δ*hupB* foram capazes de crescer na presença de ROI, não havendo a formação de halos de inibição ao redor do disco com paraquat (MV) 10 mM (Figura 19). Já as linhagens 607STi, Δ*hha* e Δ*hfq*, apresentaram uma leve sensibilidade à presença de ROI, que variou de acordo com a densidade populacional, conforme indicado entre parênteses na última coluna da tabela 05.

Tabela 05. Densidades bacterianas aplicadas nas placas de LA com paraquat (MV, 10 mM).

Linhagem	Densidades testadas (UFC.mL^{-1})	Halos de Inibição
662ST	$3x10^7$; $3x10^8$	-
662ST Δ*hupA*	$5x10^7$; $5x10^8$	-
662ST Δ*hupB*	$1x10^8$; $1x10^9$	-
662ST Δ*hupA*Δ*hupB*	$4x10^7$; $4x10^8$	-
662ST Δ*dps*	$4x10^7$; $4x10^8$	-
662ST Δ*hfq*	$4x10^7$; $4x10^8$	1 mm ($4x10^7$)
607STi	$1x10^8$; $1x10^9$	1 mm ($1x10^8$)
607STi Δ*hha*	$1x10^8$; $1x10^9$	1 mm ($1x10^8$ e $1x10^9$)

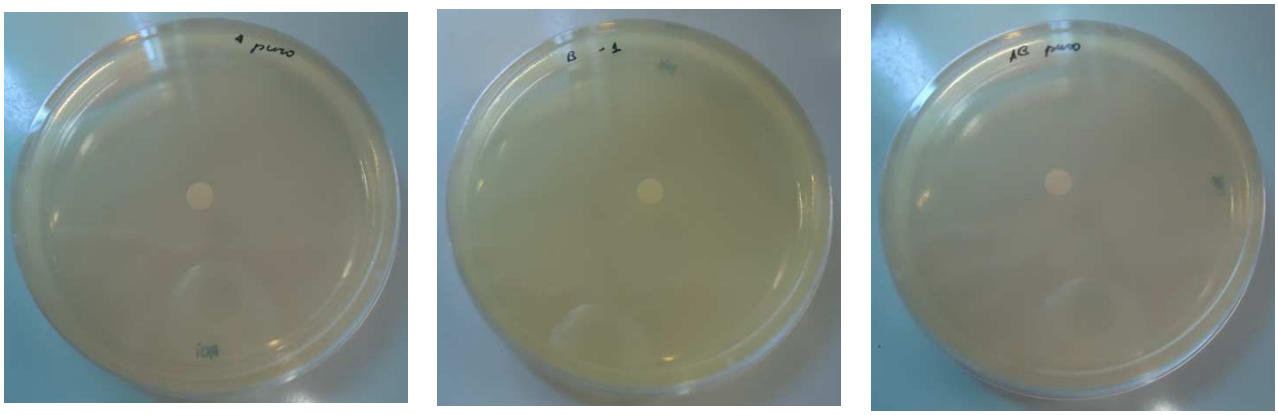


Figura 19. Ensaio de resistência a Intermediários Reativos de Oxigênio (ROI). Da esquerda para a direita, 10^8 UFC.mL^{-1} das linhagens Δ*hupA*, Δ*hupB* e Δ*hupA*Δ*hupB* foram espalhadas com alça de Drigalsky sobre placas com LA, onde posteriormente foram aplicados discos com paraquat (MV, 10 mM). Essas linhagens demonstraram ter preservado a capacidade de sobreviver em ambientes com ROI, já que não apresentaram um halo de inibição ao redor do disco com paraquat, assim como a linhagem selvagem 662ST.

5.2.7. Resistência a Intermediários Reativos de Nitrogênio (RNI)

Nos ensaios de RNI foi adotado o cultivo em meio LB com nitrito de sódio (15 μM). No entanto, essa concentração demonstrou ser elevada, já que mesmo as linhagens selvagens 662ST e 607STi apresentaram sensibilidade a RNI.

Ainda assim, foi possível comparar a sensibilidade ao nitrito de sódio apresentada pelas linhagens selvagens e recombinantes, o que permitiu inferir que não há diferenças significativas entre essas linhagens. Nesse caso o desvio padrão não foi apresentado, pois não houve diferenças significativas entre as triplicatas de cada ponto amostral (Figura 20).

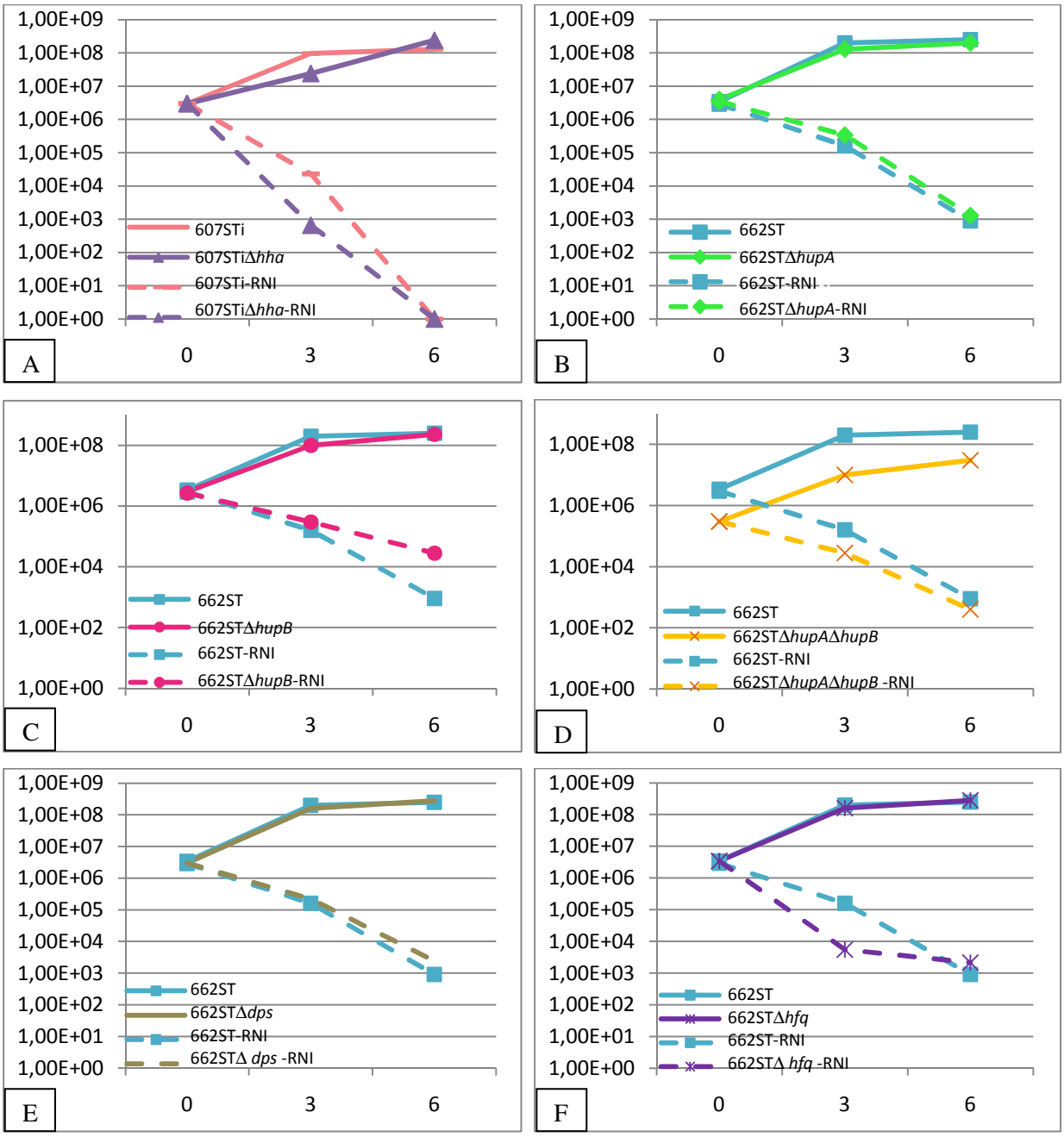


Figura 20. Ensaios de resistência a Intermediários Reativos de Nitrogênio (RNI). As amostras foram incubadas em meio LB (pH 5,0) com e sem nitrito de sódio 15 µM (linhas tracejadas e sólidas, respectivamente) e a densidade populacional foi determinada em UFC.mL^{-1} (eixo y) nos tempos 0, 3 e 6 horas (eixo x). Os gráficos de cada linhagem estão diferenciados por letras maiúsculas conforme segue, A: 607STi e 607STiΔ*hha*; B: 662ST e 662STΔ*hupA*; C: 662ST e 662STΔ*hupB*; D: 662ST e 662STΔ*hupA*Δ*hupB*; E: 662ST e 662STΔ*dps*; F: 662ST e 662STΔ*hfq*.

5.3. Atenuação e proteção no modelo murino

5.3.1. Inoculação intraperitoneal

A inoculação de linhagens selvagens de *S. enterica* via intraperitoneal desencadeia uma infecção rápida, provocando o óbito do hospedeiro preliminarmente à via oral, já que no primeiro caso o patógeno é inoculado de forma sistêmica.

Sendo assim, grupos de animais compostos por 03 camundongos fêmeas BALB/c foram inoculados com 100 µL das suspensões bacterianas para verificação da atenuação das linhagens recombinantes. Por constituir uma infecção sistêmica, na inoculação intraperitoneal o número de bactérias suficiente para provocar óbito é reduzido, sendo que foi estabelecido previamente por Mendes (2008) que a DL_{50} para as linhagens selvagens 662ST e 607STi é de 10^3 UFC. Devido a isso, foram aplicadas doses entre 10^2 e 10^5 UFC e em paralelo, como controle, um grupo de animais foi inoculado apenas com PBS (pH 7,4) via intraperitoneal.

Enquanto a inoculação da linhagem Δ*hfq* não gerou óbitos, as linhagens selvagem 662ST e recombinante Δ*dps* provocaram a morte de todos os animais infectados (Figura 21).

Os dados obtidos para a linhagem Δ*hfq* confirmam que a deleção desse gene acarreta a atenuação da virulência (figura 21), conforme já mencionado por Sittka *et al.* (2007), e além disso nos indicam que a linhagem selvagem 662ST é passível de atenuação. Embora os resultados de Δ*hfq* possam parecer animadores a princípio, uma análise mais profunda indica que a atenuação de *hfq* é muito severa e essa intensidade de atenuação não é desejável para linhagens vacinais, uma vez que dentro do hospedeiro, linhagens acentuadamente atenuadas geralmente são incapazes de desencadear uma resposta imunológica em um nível considerável. Um exame pormenorizado do trabalho de Sittka *et al.* (2007) leva à conclusão de que a ausência do gene *hfq* é indesejada, pois esse gene exerce efeitos pleiotrópicos em processos essenciais à virulência de *Salmonella,* como a replicação intramacrofágica, a expressão de genes da SPI-1 sob crescimento aeróbio, a secreção de proteínas efetoras, a adesão e invasão de células e a motilidade flagelar pela síntese de FliC. Ainda, nesse trabalho verificamos que a deleção do gene *hfq* acarreta uma menor resistência a intermediários reativos de oxigênio quando comparada à linhagem selvagem (seção 5.2.6.), indicando que a diminuição da resistência a ROI também pode estar associada à atenuação da virulência em linhagens Δ*hfq*.

Em relação à linhagem Δ*dps* obtivemos resultados divergentes dos já apresentados por Halsey *et al.* (2004). Neste último, uma linhagem nula para o gene *dps* foi inoculada via

intraperitoneal (10^3 UFC) em um grupo composto por 4 camundongos C3H/HeN e os animais foram observados por 14 dias após o inóculo. Foi relatado apenas 01 óbito dentre os camundongos infectados com a linhagem recombinante Δ*dps* de *Salmonella enterica* Typhimurium, a partir do qual os autores propuseram a atenuação da virulência promovida pela deleção do gene *dps*. Entretanto, o mesmo não foi observado neste trabalho, já que todos os animais inoculados com a linhagem 662STΔ*dps* nos títulos 10^3 e 10^5 UFC evoluíram ao óbito (Figura 21). De qualquer forma, em nosso estudo, utilizamos a infecção de camundongos da linhagem BALB/c e não C3H/HeN, o que poderia explicar em parte os dados discrepantes.

Quando inoculados com 10^2 e 10^4 UFC da linhagem 662STΔ*hupA* cerca de 34% dos animais sobreviveram em ambos os casos (Figura 22). Mesmo considerando que as doses administradas com Δ*hupB* foram 10 vezes superior (10^3 e 10^5) ao utilizado para Δ*hupA*, é possível concluir que esta última linhagem apresenta uma atenuação via intraperitoneal, não constatada em Δ*hupB*. Enquanto a inoculação com 10^3 UFC de Δ*hupB* levou 100% da população ao óbito, a administração de 10^4 UFC de Δ*hupA* permitiu a sobrevivência de parte da população (Figura 22). A linhagem 662STΔ*hupB* ocasionou mortes na mesma proporção que a linhagem selvagem, porém com uma delonga maior, pois Δ*hupB* levou 7 dias a mais do que a linhagem selvagem para promover a mortalidade de 100% da população.

A linhagem 662STΔ*hupA*Δ*hupB* demonstrou ser avirulenta em camundongos BALB/C quando inoculada intraperitonealmente na dose 10^3 UFC, já que 100% dos animais sobreviveram (figura 22, gráfico A), considerando que essa dose é letal para a linhagem selvagem. Quando os animais foram inoculados com um título 100 vezes superior (10^5 UFC), ocorreu o óbito de aproximadamente 66% da população. Embora a princípio o resultado do segundo ensaio pareça desanimador, já que nem toda a população sobreviveu (figura 22, gráfico B), é importante ressaltar que a atenuação severa de uma linhagem não é ideal para sua utilização como vetor vacinal, pois geralmente linhagens excessivamente atenuadas são incapazes de proteger o hospedeiro após o desafio com a linhagem selvagem.

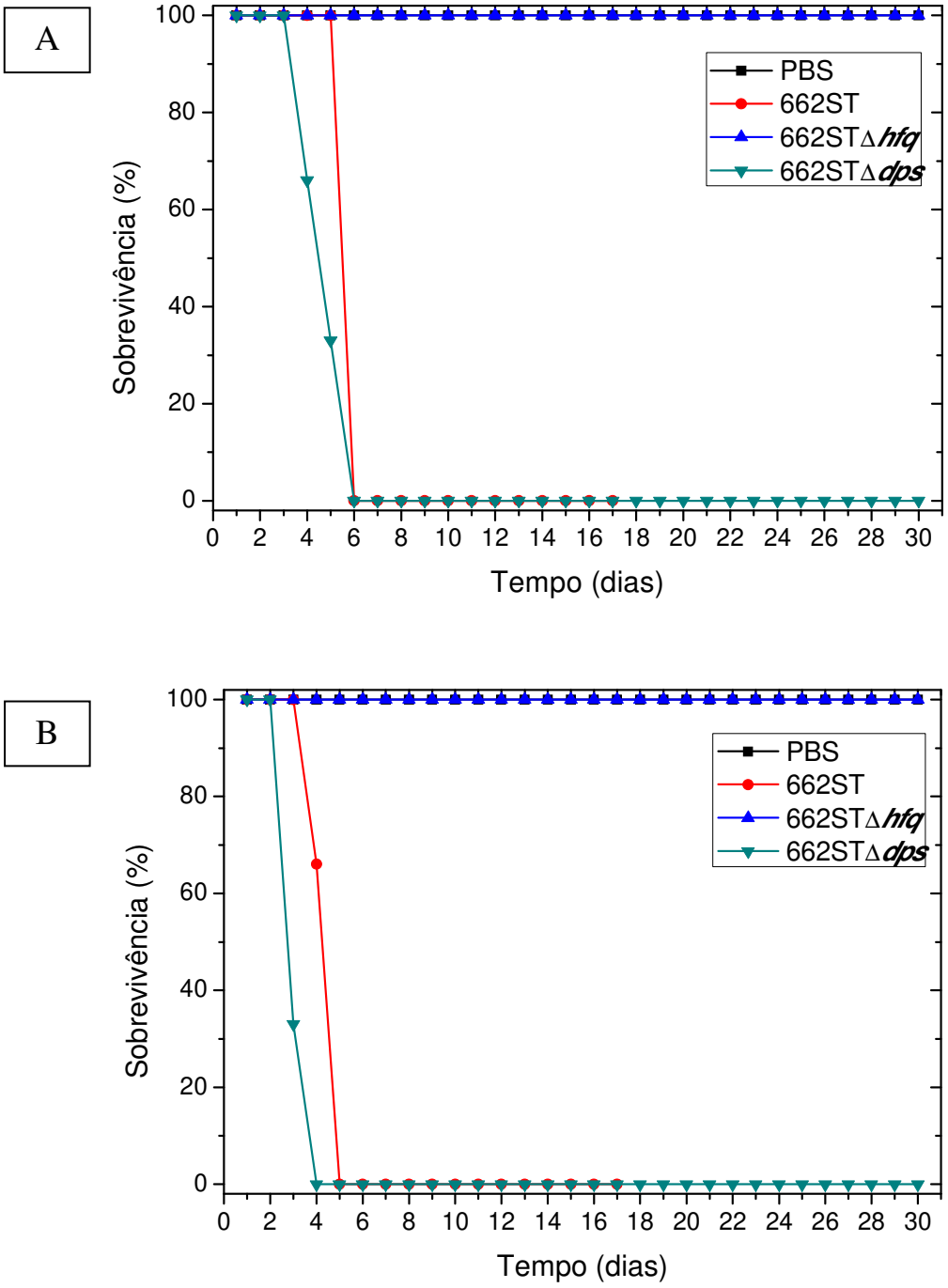


Figura 21. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com 10^3 (A) e 10^5 (B) UFC das linhagens 662ST, 662STΔ*hfq* e 662STΔ*dps* via intraperitoneal. O grupo controle foi inoculado apenas com o tampão PBS.

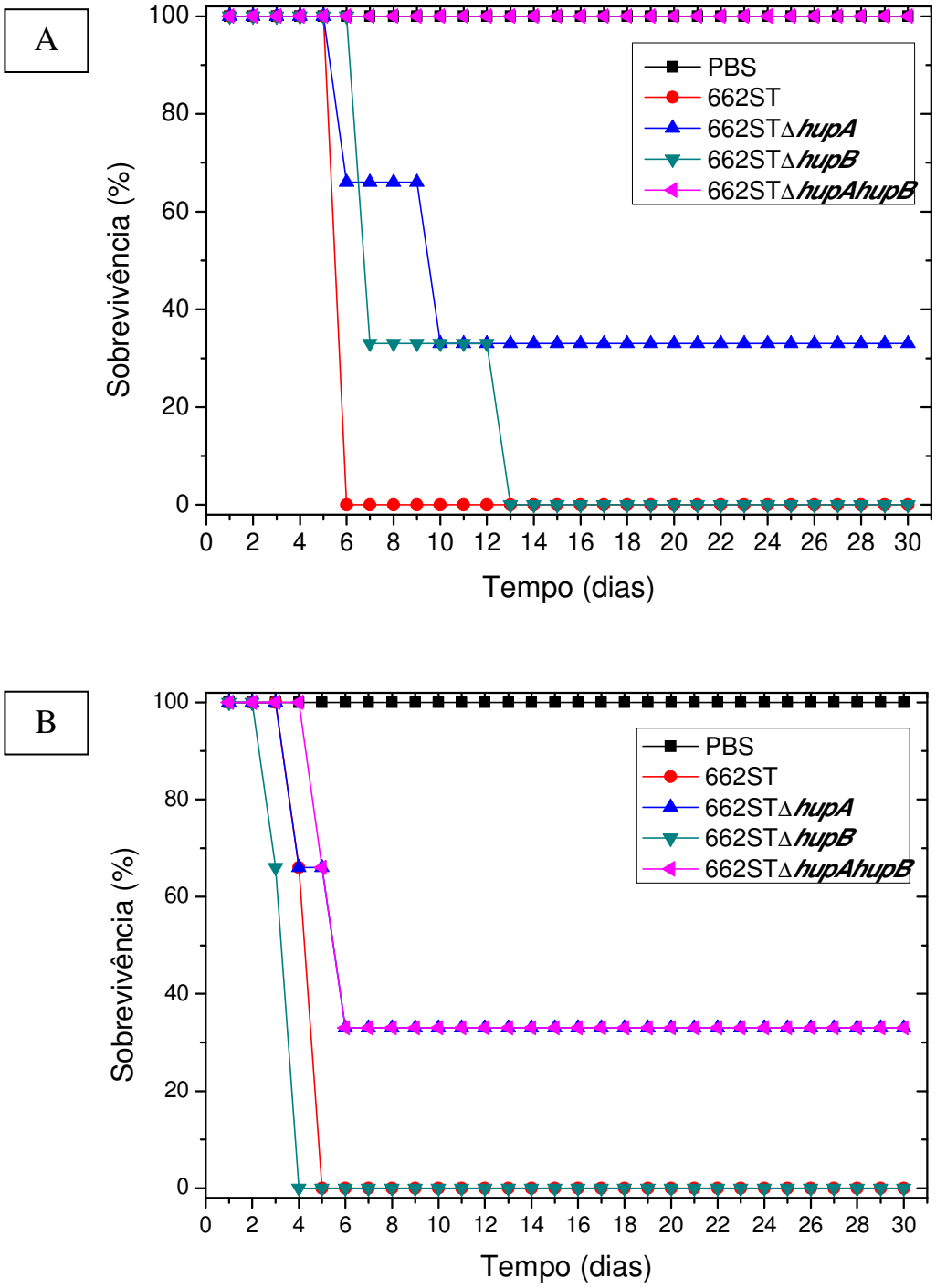


Figura 22. Sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com mutantes HU via intraperitoneal. Os gráficos demonstram ensaios com animais infectados com 10^3 (A) e 10^5 (B) UFC das linhagens, exceto Δ*hupA*, que foi inoculado em uma densidade inferior ($4x10^2$ e $4x10^4$ UFC, respectivamente). Apesar da diferença quantitativa dos inóculos, é possível concluir que

Δ*hupA* apresentou uma atenuação maior do que Δ*hupB*, já que a inoculação de $4x10^4$ UFC de Δ*hupA* permitiu a sobrevivência de 34% da população, enquanto que Δ*hupB* levou toda a população ao óbito, mesmo quando administrado em doses inferiores. O grupo controle foi inoculado com o tampão PBS.

A figura 23 ilustra os resultados da inoculação intraperitoneal da linhagem 607STiΔ*hha*, que gerou a mesma proporção de óbitos do que a linhagem selvagem 607STi, indicando que não houve atenuação da virulência para as doses testadas. Apesar disso, a possibilidade de atenuação da virulência via oral não foi descartada (Seção 5.3.2.).

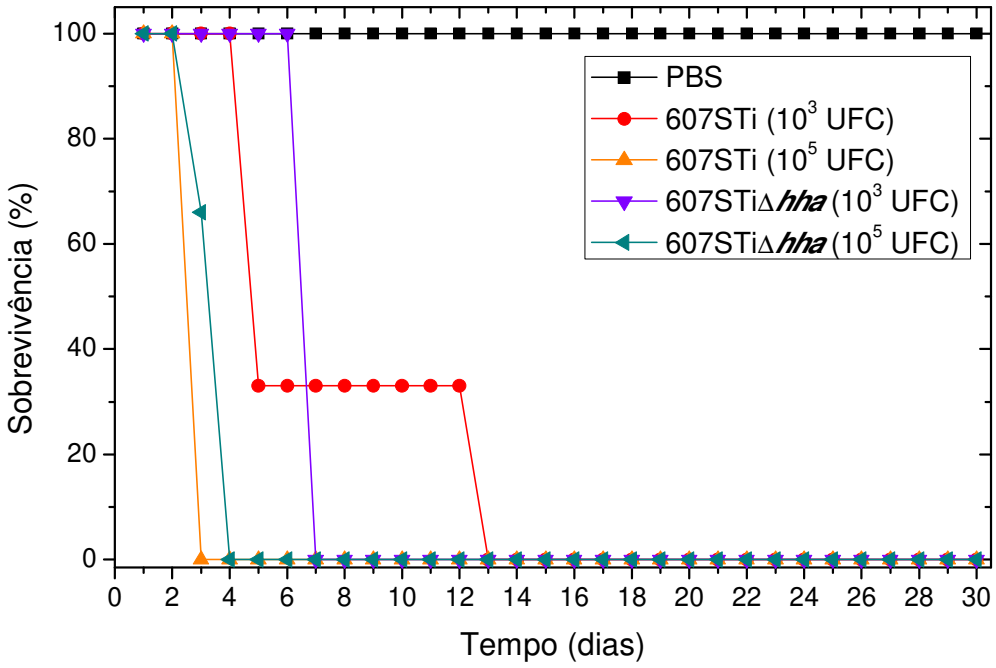


Figura 23. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c após a inoculação intraperitoneal com as linhagens selvagem 607STi e recombinante 607STiΔ*hha*, nas doses indicadas na legenda do gráfico. O grupo controle foi inoculado com o tampão PBS.

5.3.2. Inoculação intragástrica

Como a infecção por *S. enterica* normalmente ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados, a via oral compõe o modelo clássico de inoculação desse patógeno. Embora em camundongos BALB/c a infecção com *S. enterica* Typhimurium evolua para nível sistêmico, em humanos geralmente essa infecção limita-se ao trato intestinal. Não obstante, a infecção de

camundongos BALB/c via oral é o modelo mais aceito e utilizado, até mesmo porque a resposta nesses animais compõe uma variável discreta (óbito ou sobrevivência), facilitando a verificação imparcial da atenuação da virulência de linhagens recombinantes de *S. enterica*.

Grupos compostos por 03 animais foram inoculados com 100 µL das suspensões bacterianas para verificação da atenuação das linhagens. No grupo controle foi feita a gavagem com tampão PBS, sendo que neste grupo não houve mortalidade de animais.

De modo idêntico aos ensaios intraperitoneais, nas inoculações intragástricas a linhagem Δ*hfq* não provocou o óbito de nenhum animal, mesmo na dose de 10^8 UFC, indicando a acentuada atenuação da virulência provocada pela deleção do gene *hfq* (Figura 24).

As infecções orais com a linhagem Δ*dps* também exibiram o mesmo comportamento dos ensaios intraperitoneais, provocando o óbito de todos os animais, independente da dose administrada (Figura 24). Mais uma vez, nossos dados refletem que há controvérsias entre nossas observações e as descritas por Halsey *et al.* (2004), pois de acordo com o modelo murino e títulos por nós testados, sugerimos que a deleção do gene *dps* não reduz a virulência de *S. enterica*. De qualquer forma, estas comparações devem ser feitas cautelosamente, pois a linhagem de camundongos adotada em nosso estudo é diversa daquela utilizada por Halsey *et al.* (2004).

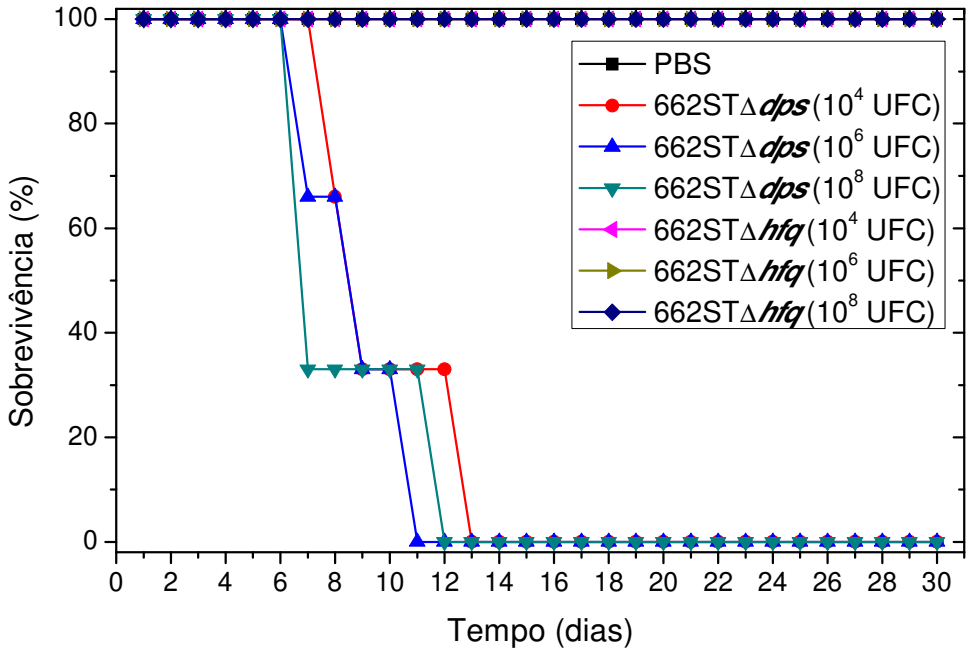


Figura 24. Sobrevivência de camundongos BALB/c após a administração oral das linhagens Δ*dps* e Δ*hfq* nas doses indicadas na legenda do gráfico, sendo cada grupo composto por 03 animais. O

controle foi constituído por um grupo inoculado com tampão PBS.

Quando administrada nas doses 10^4 e 10^6 UFC, a linhagem 607STiΔ*hha* permitiu a sobrevivência de 100% dos animais, indicando que houve atenuação da virulência via oral (figura 25), tendo em vista que nessas doses a linhagem selvagem promove a morte de toda a população. Ao aumentar a dose de 607STiΔ*hha* para 10^8 UFC, pouco mais que 30% da população sobrevive, indicando que não houve uma elevada atenuação da virulência, como para Δ*hfq*. Sendo assim, o mutante 607STiΔ*hha* foi selecionado para continuidade dos experimentos de proteção e desafio, com imunização dos animais com 10^6 UFC, pois mesmo infectando os animais com 10^7 UFC, ainda há morte de ~50% da população (dados não mostrados).

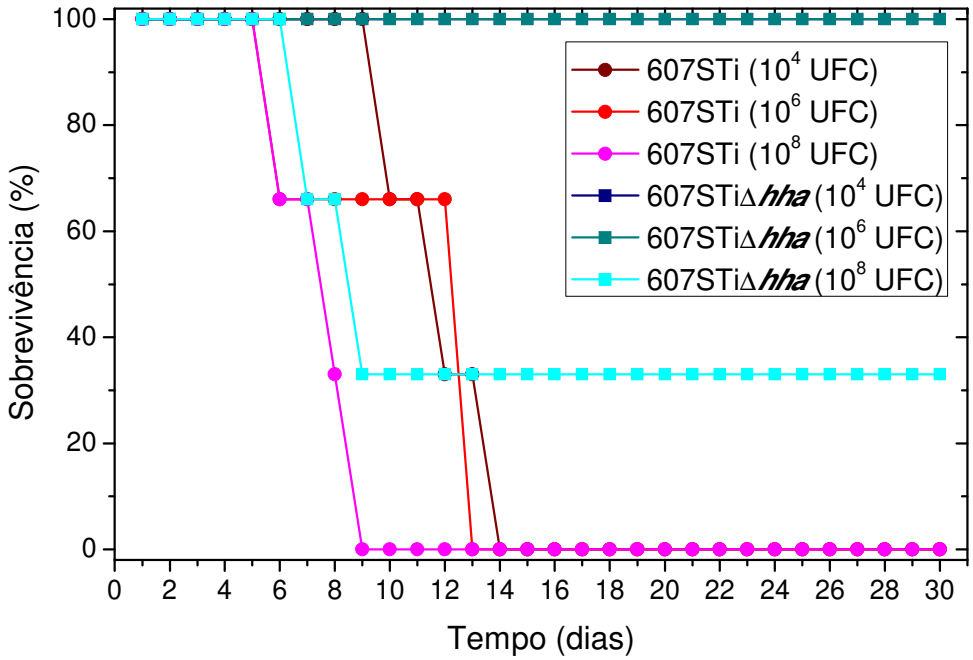


Figura 25. Sobrevivência de animais infectados oralmente com diferentes doses, indicadas na legenda do gráfico, das linhagens selvagem 607STi (esferas vermelhas e rosas) e mutante Δ*hha* (quadrados azuis).

A linhagem 662STΔ*hupA* demonstrou atenuação da virulência, pois 30 e 65% dos animais infectados com 10^8 e 10^6 UFC dessa linhagem, respectivamente, sobreviveram. Frisando que a linhagem selvagem provoca o óbito de 100% da população quando inoculada nessas doses. Ainda assim, o mutante Δ*hupA* não compõe uma formulação vacinal ideal, pois para as doses testadas, não houve sobrevivência de 100% dos animais, necessária para promover uma imunização segura

(Figura 26).

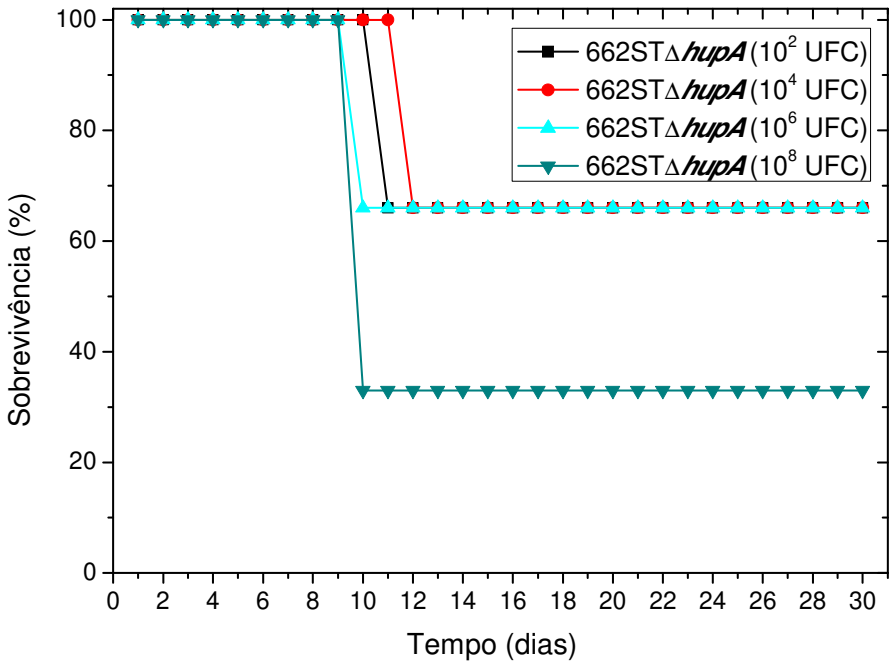


Figura 26. Sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com a linhagem recombinante 662STΔ*hupA* em diferentes doses (indicadas na legenda do gráfico).

A linhagem recombinante 662STΔ*hupB* apresentou a mesma taxa de sobrevivência da linhagem 662STΔ*hupA* quando ambas foram inoculadas na dose 10^4 UFC (sobrevivência de 65% da população). No entanto, Δ*hupB* apresentou um gradiente contínuo de "dose *versus* óbito", pois enquanto a administração das doses 10^2, 10^4 e 10^6 UFC de Δ*hupA* gerou a mesma taxa de sobrevivência de 65%, que só se alterou para 34% frente à inoculação com 10^8 UFC; para Δ*hupB* a inoculação das doses 10^2, 10^4 e 10^6 UFC promoveu a sobrevivência de 100%, 65% e 34% da população, respectivamente (Figura 27). Ainda, a comparação desses dados sugere que a atenuação promovida pela deleção de *hupA* foi maior do que a de *hupB*, assim como nos ensaios intraperitoneais. Isso porque a taxa de sobrevivência de animais inoculados oralmente com 10^6 UFC foi duas vezes maior para Δ*hupA* do que para Δ*hupB*, ainda que ambos os genes codifiquem subunidades da mesma proteína. É possível especular que homodímeros αα (formados apenas pela expressão do gene *hupA* no mutante Δ*hupB*) têm maior intersecção de atividades com o heterodímero αβ, uma vez que a virulência do mutante Δ*hupB* é manteve-se próxima a da

selvagem.

Apesar de 662STΔ*hupB* não ter ocasionado óbitos quando administrado com 10^2 UFC, não é possível especular que houve uma atenuação a nível seguro, pois essa dose é pequena e insuficiente para matar toda a população mesmo para a linhagem selvagem (dados não mostrados).

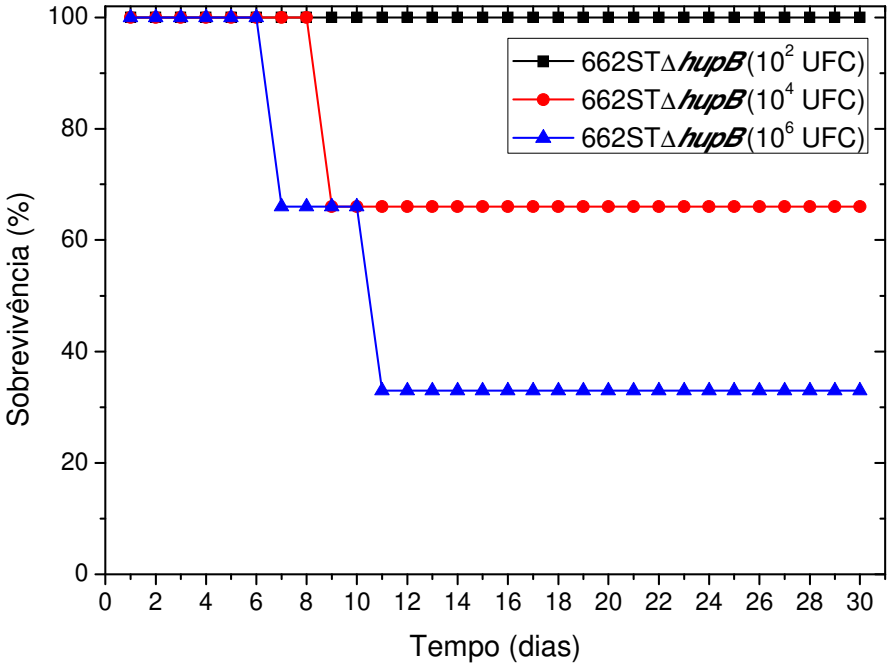


Figura 27. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com diferentes títulos, indicados na legenda do gráfico, da linhagem mutante 662STΔ*hupB*.

A linhagem duplo mutante 662STΔ*hupA*Δ*hupB* apresentou um eminente potencial vacinal, por não provocar o óbito de camundongos inoculados com dosagens de 10^8 UFC, ideais para uma considerável indução do sistema imune do hospedeiro (Figura 28). Logo, essa linhagem foi selecionada para experimentos de imunização e proteção contra o desafio com a linhagem selvagem.

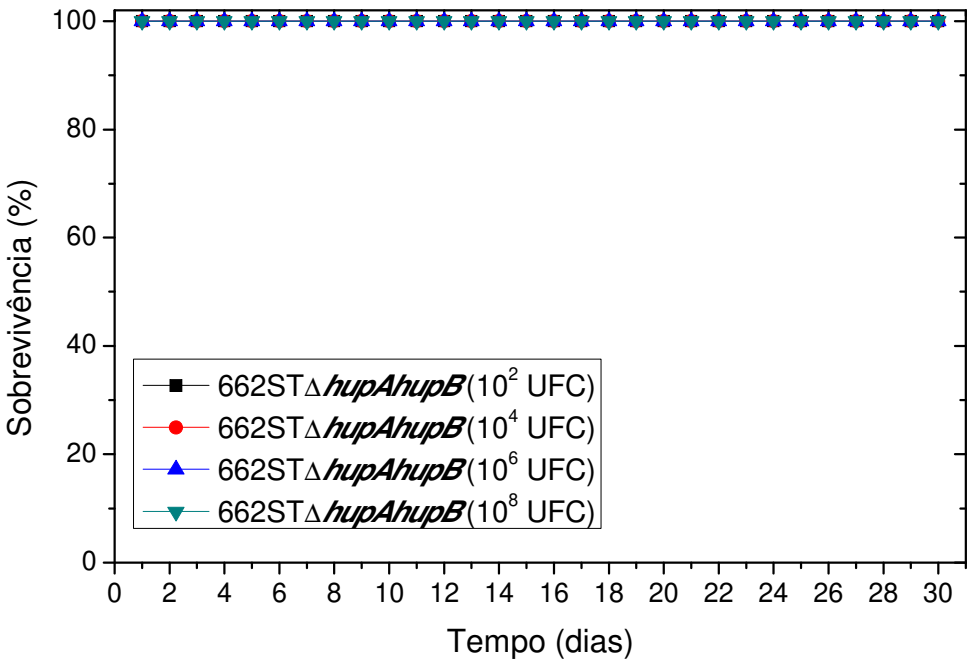


Figura 28. A inoculação via oral da linhagem recombinante 662STΔ*hupA*Δ*hupB* permitiu a sobrevivência de 100% dos animais infectados com todas as doses testadas (mostradas na legenda do gráfico), evidenciando sua avirulência em camundongos BALB/c.

Para melhor comparação dos resultados obtidos para os mutantes HU em relação à bactéria selvagem, seguem gráficos com os dados dessas linhagens apresentados em conjunto (Figura 29).

A deleção dos genes *hupA* e *hupB* promoveu diferentes níveis de atenuação da virulência, apesar de codificarem subunidades da mesma proteína. A deleção do gene *hupB* acarretou um nível de atenuação menor do que o promovido pelo nocaute do gene *hupA* (Figura 29). Somente a deleção de ambos os genes gerou uma atenuação maior, provavelmente por excluir o mecanismo de compensação que um gene *hup* confere na ausência do outro.

Dessa forma, os dados sugerem que a proteína HU pode atuar como homodímero em *S. enterica*, suprindo a deficiência ocasionada pela deleção de apenas uma subunidade protéica. Na ausência de ambas as subunidades, como no caso do duplo mutante Δ*hupA*Δ*hupB*, a virulência de *Salmonella* é relevantemente reduzida (Figura 29). Este estudo revela a importância dos genes *hupA* e *hupB* para a biologia de *Salmonella*, uma vez que esses genes estão associados a diferentes propriedades regulatórias de fatores de patogenecidade, pois a deleção de uma das subunidades protéicas ou de ambas acarreta diferentes graus de atenuação da virulência, conforme demonstrado

nos gráficos a seguir (Figura 29).

Uma perspectiva futura é a elucidação dessas propriedades regulatórias, pois este trabalho pela primeira vez investigou a influência da deleção dos genes *hup* na virulência de *S. enterica*, revelando sua extrema importância. Essa elucidação poderia ser alcançada por estudos de expressão gênica diferencial, como transcriptoma ou proteoma, como já foi realizado para o gene *fis*. A natureza pleiotrópica de *fis* foi analisada por estudos proteômicos com mutantes nulos para esse gene, indicando a relevante importância do gene *fis* para a virulência de *S. enterica*, conforme revelado pela atenuação dos mutantes Δ*fis* (Yoon *et al*., 2003). Da mesma forma, proteínas diferencialmente expressas nos mutantes Δ*hupA*, Δ*hupB* e Δ*hupA*Δ*hupB* poderiam ser detectadas por eletroforese bidimensional e identificadas por espectrometria de massas, elucidando o papel desses genes em *S. enterica*.

Mutantes de *S. enterica* para outras proteínas associadas ao nucleóide bacteriano ("nucleoid associated proteins") já foram construídos, como Δ*fis*. Nosso grupo de pesquisa já investigou a atenuação promovida pela deleção do gene *fis* por meio da inoculação da linhagem 662STΔ*fis* em camundongos BALB/c. Quando o mutante Δ*fis* foi inoculado no título 10^6 UFC não houve óbito de animais, porém quando inoculado com 10^8 UFC, 20% da população evoluiu ao óbito oito dias após a infecção (Oliveira *et al*., artigo em preparo). A comparação entre os resultados de inoculação de camundongos com 10^8 UFC das linhagens 662STΔ*hupA*Δ*hupB* e 662STΔ*fis* revela que o nível de atenuação atingido no primeiro mutante é maior do que no segundo, já que a infecção com a linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* nessa dose possibilitou a sobrevivência de 100% da população, enquanto Δ*fis* gerou uma taxa de 80% de sobrevivência.

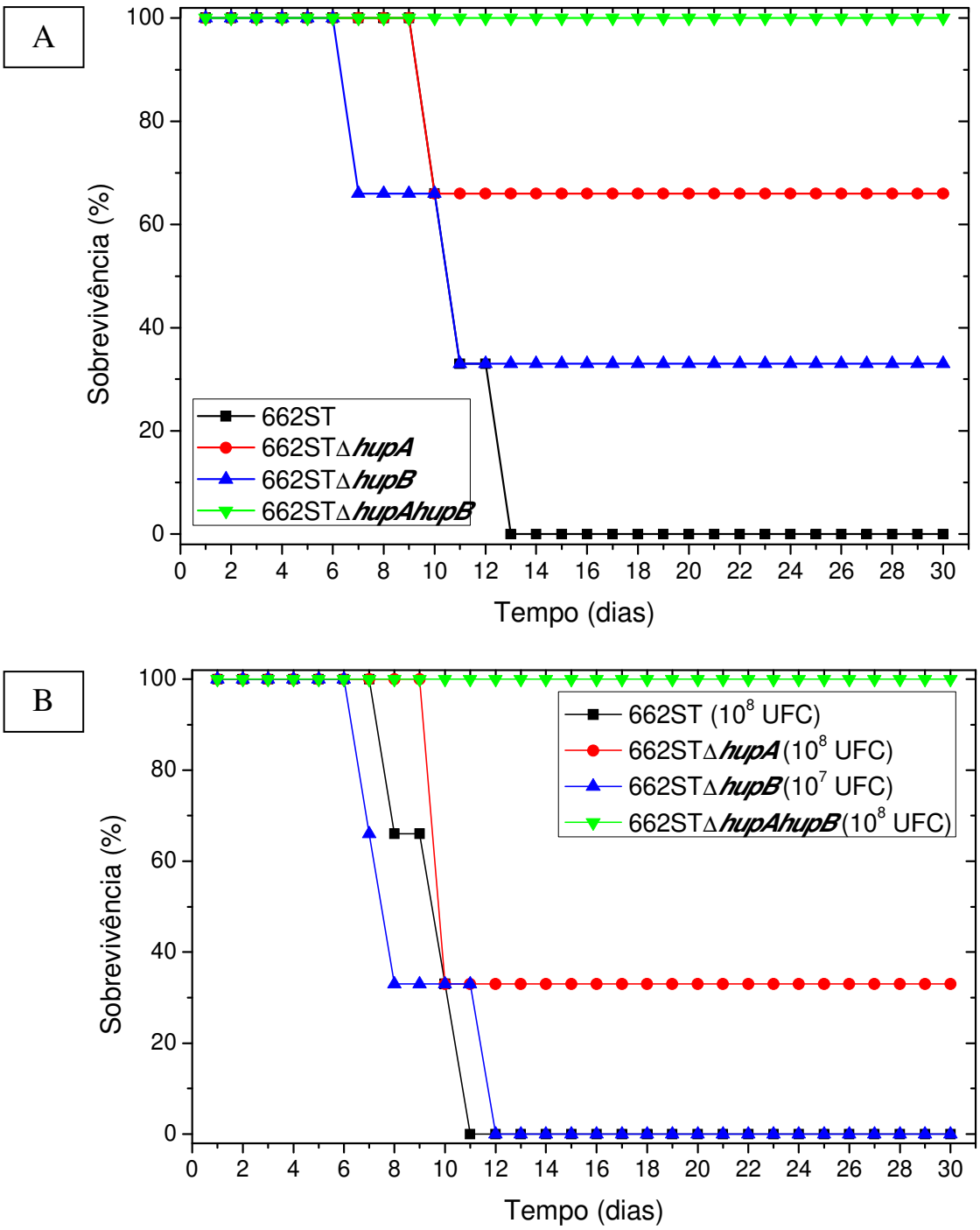


Figura 29. Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados oralmente com 10^6 (A), 10^7 e 10^8 (B) UFC das linhagens selvagem (quadrados pretos) e recombinantes HU. Nos dados apresentados no gráfico B, a linhagem 662STΔ*hupB* foi administrada em uma dose 10 vezes inferior as demais e ainda assim promoveu a morte de 100% da população, revelando não ter atingido a atenuação dos outros mutantes HU.

5.3.3. Determinação da DL_{50}

Conforme descrito na seção 4.7., para realizar o cálculo da DL_{50} foi utilizado um "software" baseado no método "MAI" (Welskos & O'Brien, 1994) a partir dos resultados dos ensaios de infecção oral em camundongos.

Os resultados apresentados na tabela 06 indicam que todas as linhagens recombinantes exibiram certo grau de atenuação em relação às linhagens selvagens das quais foram originadas. Além das infecções orais com a linhagem selvagem 662ST, já reportadas na seção 5.3.2., um ensaio adicional com 6 grupos de animais foi realizado. Cada grupo (n=3) foi inoculado com uma dose, desde 10^3 até 10^8 UFC, compondo uma escala logarítmica de diluições (dados não mostrados). Desse modo, foi possível estabelecer a dose letal média para a linhagem selvagem 662ST de *S. enterica*.

Não foi possível estabelecer a dose letal média das linhagens Δ*dps* e Δ*hfq* já que houve 0 e 100% de sobrevivência, respectivamente, para as doses administradas.

A comparação dos mutantes HU com a linhagem selvagem 662ST revela que é necessária uma dose 2.000 vezes maior de Δ*hupA* para matar metade da população, enquanto que uma dose 20 vezes mais elevada de Δ*hupB* é suficiente para promover a letalidade de 50% dos animais. Já a linhagem duplo mutante mostrou um nível de atenuação superior, sendo necessária uma dose ~$2{,}8 \times 10^9$ vezes maior do que a linhagem selvagem para levar metade da população ao óbito. A dose letal média para Δ*hupA*Δ*hupB* está apresentada como aproximada, pois não foi possível inocular os animais via oral com uma dose que gerasse o óbito de metade da população.

A dose letal média da linhagem 607STi já havia sido estabelecida em trabalhos anteriores no laboratório (Sales, 2007), com a obtenção do título $1{,}5 \times 10^3$ UFC. Para a linhagem recombinante 607STiΔ*hha*, a DL_{50} foi 200.000 vezes superior, ou seja, são necessárias 200.000 vezes mais bactérias recombinantes Δ*hha* em relação à selvagem para promover a morte de metade da população inoculada. Ainda assim, essa atenuação não foi suficiente para a utilização da linhagem 607STiΔ*hha* como vetor vacinal, conforme demonstrado na próxima seção (5.3.4.).

Da mesma forma, estudos anteriores com mutantes IHF ("Integration Host Factor") geraram uma DL_{50} 5 logs maior para o mutante 662STΔ*himD* e 4 logs maior para o mutante 662STΔ*himA*, que também demonstraram-se ineficientes em promover a proteção de 100% dos animais contra o desafio com a linhagem selvagem 662ST (Mendes, 2008).

Sendo assim, não basta ocorrer a atenuação da virulência em linhagens recombinantes de *S. enterica*, mas sim a atenuação da virulência a níveis que permitam a inoculação de uma quantidade elevada de bactérias, capaz de induzir o sistema imune do hospedeiro, gerando proteção contra infecções reincidentes, como ocorreu com o mutante 662STΔ*hupA*Δ*hupB* (seção 5.3.4.), que apresentou uma DL_{50} superior em relação à linhagem selvagem.

Tabela 06. DL_{50} de linhagens de *S. enterica* inoculadas via oral em camundongos BALB/c.

Linhagem	**DL_{50} (UFC)**	**Referência**
662ST	$1,5x10^4$	Este estudo
662STΔ*hupA*	$3,2x10^7$	Este estudo
662STΔ*hupB*	$3,5x10^5$	Este estudo
662STΔ*hupA*Δ*hupB*	$\sim 4,2x10^{13}$	Este estudo
607STi	$1,5x10^3$	Sales, 2007
607STiΔ*hha*	$3,1x10^8$	Este estudo

5.3.4. Imunização e Desafio

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar com a linhagem recombinante 607STiΔ*hha*, utilizando um grupo com pequeno tamanho amostral (n=3). Neste ensaio os animais foram imunizados com uma dose única de 10^6 UFC da linhagem recombinante, enquanto no grupo controle foi administrado apenas o tampão PBS. Após 30 dias, um desafio com a linhagem selvagem 607STi foi realizado, com uma dose 10.000 vezes acima da DL_{50} (10^7 UFC). Os resultados foram animadores, pois tendo em vista a elevada dose da linhagem selvagem aplicada no desafio, apenas 01 animal faleceu (Figura 30).

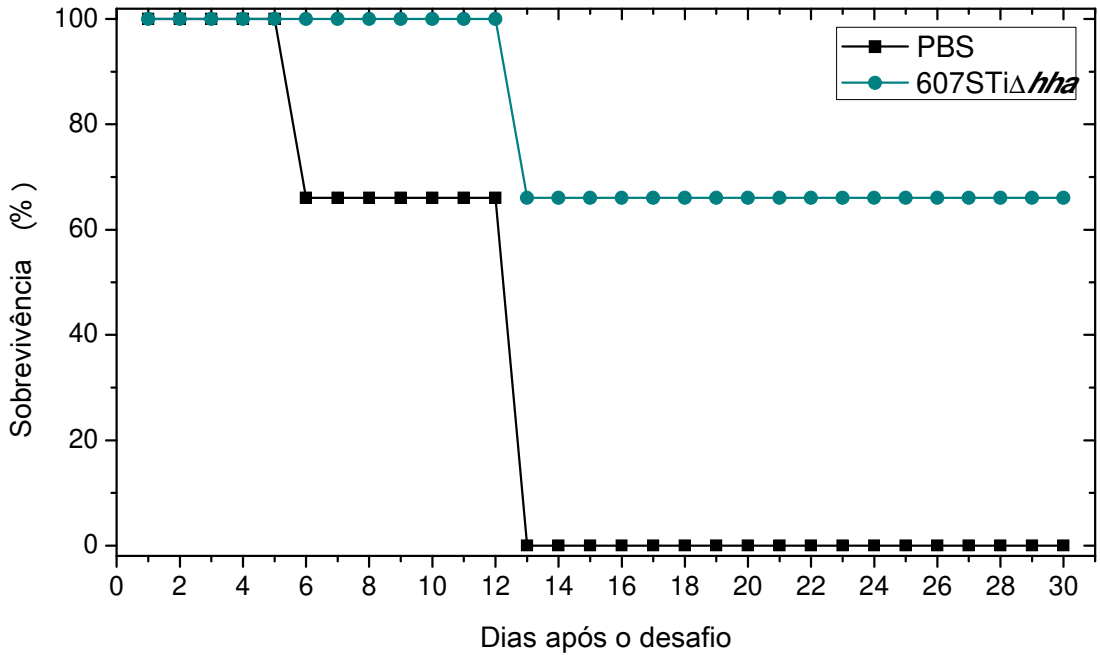


Figura 30. Ensaio piloto de sobrevivência de camundongos BALB/c imunizados oralmente com 10^6 UFC da linhagem mutante 607STiΔ*hha* e posteriormente desafiados com 10^7 UFC da linhagem selvagem 607STi (n=3).

Como os resultados mostraram-se promissores, o ensaio foi repetido em uma escala maior, com dois grupos de 05 animais cada, um com dupla e outro com única imunização. Os animais foram inoculados com 10^6 UFC, porém ocorreram óbitos de 30% da população, considerando a somatória de ambos os grupos. A partir desses resultados, decidimos descartar a linhagem mutante 607STiΔ*hha* como vetor vacinal, pois a mesma não demonstrou suficiente atenuação para tal fim e títulos bacterianos muito pequenos (no caso de aplicar uma dose inferior a 10^6 UFC) em geral são ineficientes em desencadear uma resposta imune protetora. Concluímos que a incongruência entre os resultados é oriunda do pequeno tamanho amostral (n=3) do ensaio anterior. Quando o tamanho amostral foi elevado para 05 animais por grupo, um resultado distinto foi obtido, onde a dose com 10^6 UFC da linhagem Δ*hha* promoveu o óbito de uma parcela da população. Sendo assim, é essencial confirmar os resultados por meio de duplicatas e triplicatas dos ensaios.

Devido a isso, para os ensaios de imunização e desafio com a linhagem duplo mutante ST662Δ*hupA*Δ*hupB*, o tamanho amostral foi elevado para 05 a 07 camundongos BALB/c por grupo. Em paralelo aos experimentos, sempre foi utilizado um grupo controle inoculado com PBS

e desafiado com as linhagens selvagens assim como os demais grupos, ocorrendo sempre o óbito de 100% dos animais.

O primeiro ensaio foi realizado inoculando camundongos (n= 7) com uma dose de 10^7 UFC da linhagem Δ*hupA*Δ*hupB*. O desafio foi realizado somente 60 dias após a imunização, visando avaliar a longevidade da resposta imune gerada no hospedeiro, já que os desafios convencionais são realizados 15 a 30 dias após a vacinação. O desafio foi executado com uma dose 1000 vezes superior a DL_{50} da linhagem virulenta 662ST (10^7 UFC). Adicionalmente, foi feito um segundo ensaio de longevidade com algumas adaptações, no caso imunização com 10^8 UFC e desafio com a mesma dose da linhagem selvagem (10^7 UFC), porém 70 dias depois da imunização (n=5). Ambos os ensaios estão apresentados na figura 31.

Para o grupo com imunização com 10^7 UFC, a taxa de sobrevivência dos animais desafiados foi 70%. Já o grupo com imunização única com 10^8 UFC gerou uma taxa de sobrevivência de 80%, ou seja, superior ao ensaio de longevidade com imunização com 10^7 UFC (70%). Esses resultados sugerem que a quantidade de bactérias inoculadas na imunização é crucial e, portanto um fator determinante para a sobrevivência dos animais, mais importante do que o intervalo de tempo decorrido entre a imunização e o desafio. Essa conclusão é decorrente da comparação desse resultado (figura 31) com os ensaios com desafios convencionais após 30 dias, apresentados adiante.

Sendo assim, os animais imunizados conseguem responder ao desafio mesmo depois de um longo período após a imunização, indicando uma proteção prolongada e proporcionalmente eficaz ao número de bactérias inoculadas.

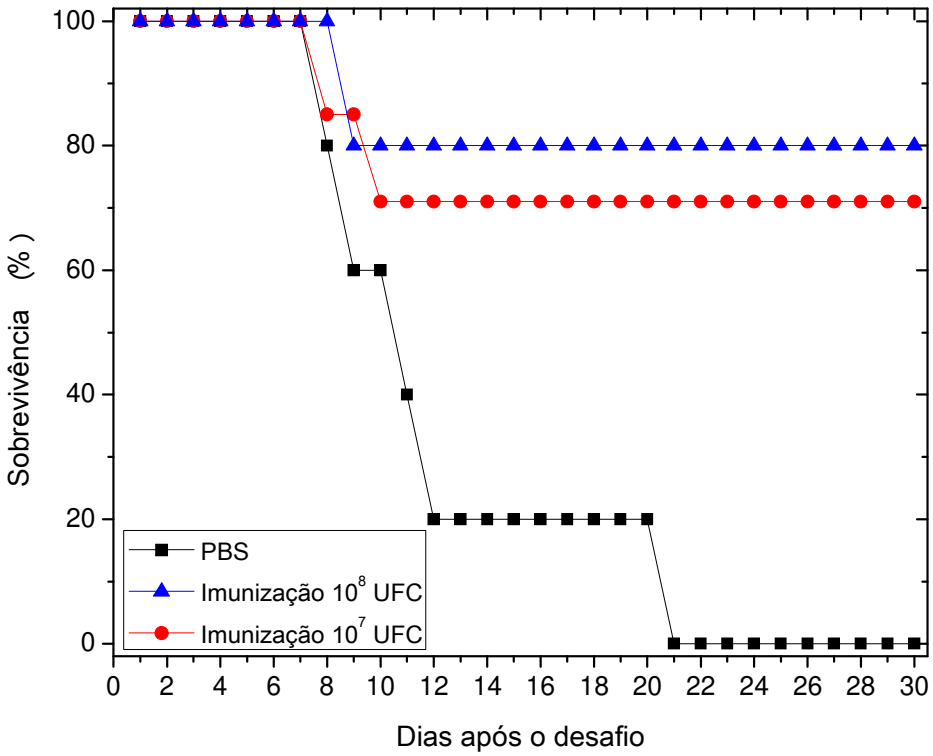


Figura 31. Ensaio de longevidade com imunização única de camundongos BALB/c com 10^7 e 10^8 UFC da linhagem duplo mutante de *S. enterica* Δ*hupA*Δ*hupB*, seguido por desafio após 60 e 70 dias, respectivamente, com 10^7 UFC da linhagem selvagem 662ST (dose 1000 vezes superior a DL_{50}).

Como a imunização única dos animais com a linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* foi mais eficaz com a dose 10^8 UFC, resolvemos realizar uma nova vacinação com essa dose, adotando o desafio convencional após 30 dias. Em paralelo, outro grupo de animais também foi imunizado e após 14 dias esse grupo recebeu uma segunda dose de imunização com 10^8 UFC da linhagem de *S. enterica* 662STΔ*hupA*Δ*hupB*. O desafio foi realizado com 10^7 UFC da linhagem selvagem 662ST (dose 1000 vezes superior a DL_{50}) no 28° dia após a primeira imunização de ambos os grupos. Um grupo controle foi administrado com tampão PBS no lugar das vacinações e posteriormente foi desafiado da mesma forma que os grupos imunizados. Os animais foram acompanhados diariamente durante 30 dias após o desafio para observação de óbitos (Figura 32).

O resultado mais interessante do ensaio apresentado na figura 32 foi observado no grupo com imunização dupla, pois 100% dos animais foram protegidos contra o desafio com uma dose letal da linhagem selvagem 662ST. Enquanto todos os animais do grupo sem vacinação (PBS)

sucumbiram, nenhum animal do grupo imunizado com duas doses da linhagem duplo mutante evoluiu ao óbito.

Já o grupo de imunização única não apresentou diferenças significativas em relação ao ensaio anterior, em que as mesmas doses foram aplicadas, mas o desafio foi realizado somente 70 dias após a imunização. Embora neste último a taxa de sobrevivência tenha sido de 80% (figura 31) e no ensaio com desafio após 30 dias a taxa tenha se elevado para 85% (figura 32), é preciso considerar que o mesmo número de óbitos ocorreu, ou seja, 01 animal em cada ensaio. A diferença na taxa de sobrevivência se deve à variação no tamanho amostral, de 05 animais para o ensaio de longevidade e 07 animais para o grupo com desafio após 30 dias.

É crucial observar que o desafio foi realizado com uma quantidade extremamente elevada da linhagem selvagem (10^7 UFC) e por isso um novo ensaio de imunização única foi realizado, mas com desafio utilizando uma dose 100 vezes superior a DL_{50} (10^6 UFC) e não mais 1000 (Figura 33). O desafio com uma dose 100 vezes superior a DL_{50} é convencionalmente apresentado na literatura, sendo bem aceito. Além disso, foi anteriormente demonstrado que a inoculação com 10^6 UFC da linhagem 662ST é letal para camundongos BALB/c (Gráfico A, figura 29). Trabalhos previamente realizados por nosso grupo de pesquisa também demonstraram que todos os animais infectados com 10^4 UFC da linhagem selvagem 662ST de *S. enterica* evoluem ao óbito (Oliveira *et al*., artigo em preparo).

Conforme demonstra a figura 33, mesmo desafiando os animais com uma dose 1 log inferior ao utilizado nos ensaios anteriores (figuras 31 e 32) não há sobrevivência de 100% dos animais imunizados uma única vez, pois da mesma forma ocorreu o óbito de 01 animal, gerando uma taxa de sobrevivência de 80% (n=5).

Como não foi possível atingir a proteção de 100% dos animais apenas com uma dose vacinal, mesmo reduzindo o título aplicado no desafio, os ensaios posteriores foram padronizados com o desafio com 10^7 UFC da linhagem selvagem. Uma duplicata do ensaio com imunização única (10^8 UFC) e desafio após 30 dias com uma dose 1000 vezes superior a DL_{50} (10^7 UFC) da linhagem selvagem foi realizada (dados não mostrados). Nesse ensaio, a taxa de sobrevivência dos animais inoculados (n=6) reduziu-se para 50%, indicando uma variação no número de sobreviventes em relação ao primeiro ensaio com as mesmas condições (Figura 32). Essa diferença de sobrevivência em resposta à vacinação única pode ser oriunda de uma variação na resposta imune incitada nos animais. No caso da imunização dupla, em que um primeiro estímulo é

reforçado com a segunda dose de vacinação, não há variação na taxa de sobrevivência (Figuras 32 e 33).

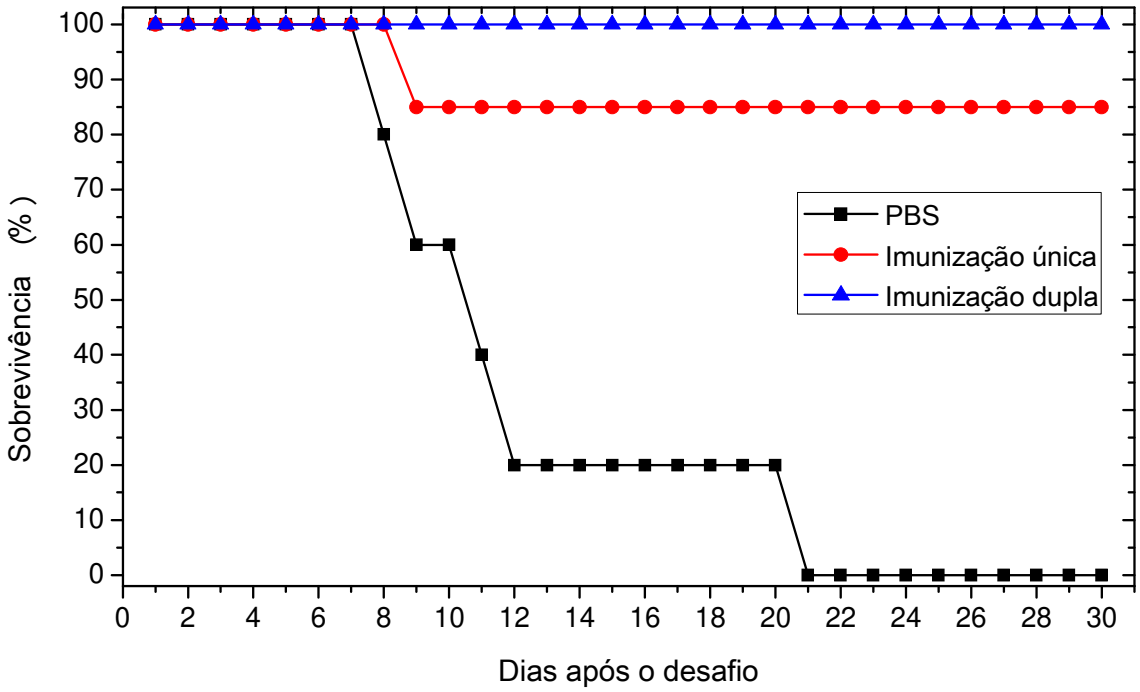


Figura 32. Proteção induzida pela imunização com a linhagem duplo recombinante 662ST*ΔhupAΔhupB*. Camundongos BALB/c foram imunizados uma dose (esferas vermelhas) ou duas doses (triângulos azuis) com 10^8 UFC da linhagem duplo mutante e foram desafiados 28 dias após a primeira imunização com uma dose 1000 vezes superior à DL_{50} da linhagem selvagem virulenta 662ST. O grupo controle foi inoculado com tampão PBS no lugar das vacinações.

Como os melhores resultados de proteção para a linhagem recombinante ST662*ΔhupAΔhupB* foram obtidos a partir de ensaios com dupla imunização, duplicatas e triplicatas foram realizadas para a confirmação dos resultados. O desafio procedeu-se 30 dias após a segunda imunização (figura 33) e não mais após a primeira, como anteriormente realizado (Figura 32). Esse intervalo maior foi definido para garantir o restabelecimento do sistema imune a níveis homeostáticos, frente à sua ativação ocasionada pelas inoculações bacterianas. Executar o desafio após um período mais prolongado é apropriado a fim de evitar resultados mascarados, promovidos por uma ativação inespecífica do sistema imune e não pelas vacinações em si.

A figura 33 ilustra o resultado obtido na duplicata com desafio 30 dias após a segunda

imunização, confirmando o resultado do primeiro ensaio, com proteção de 100% dos animais vacinados com duas doses da linhagem 662ST*ΔhupAΔhupB*. Ainda, foi realizada uma triplicata seguindo as mesmas condições do ensaio mostrado na figura 33 e novamente foi obtida uma taxa de 100% de sobrevivência da população (dados não mostrados), indicando a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados e elevado potencial da utilização de mutantes de *S. enterica* *ΔhupAΔhupB* como linhagem e vetor vacinal, demonstrado pela proteção total dos animais contra o desafio com uma dose letal da cepa selvagem (10^7 UFC).

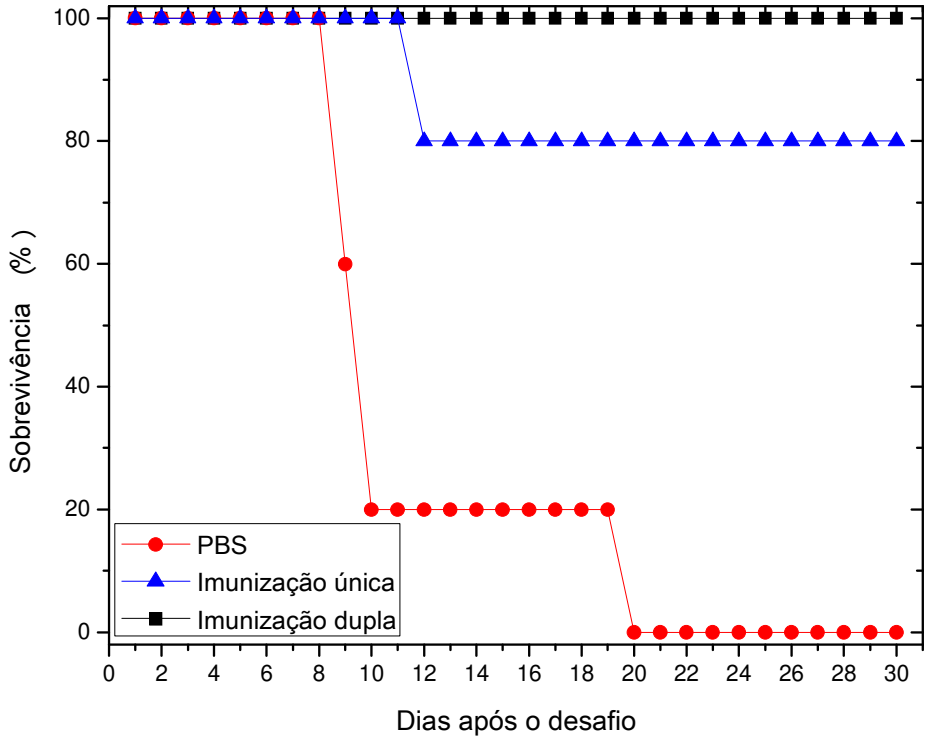


Figura 33. Ensaio de imunização com 1 e 2 doses (10^8 UFC) da linhagem recombinante 662ST*ΔhupAΔhupB* e desafio após 30 dias com as doses letais de 10^6 e 10^7 UFC da linhagem selvagem 662ST, respectivamente. O grupo controle foi inoculado com tampão PBS no lugar das vacinações e desafiado com 10^7 UFC da linhagem selvagem. O ensaio de imunização dupla foi repetido mais uma vez sob as mesmas condições e foi constatada novamente a proteção de 100% dos animais vacinados e 0% do grupo placebo (PBS).

Dentre os mutantes para "nucleoid associated proteins" já desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, como Δ*himA*, Δ*himD* e Δ*fis*, a linhagem 662ST*ΔhupAΔhupB* foi a mais promissora,

pois até então gerou os melhores dados de proteção. Quando animais imunizados com mutantes IHF foram desafiados com 10^6 UFC da linhagem selvagem 662ST, não houve sobrevivência de 100% da população. Tanto para Δ*himA* quanto para Δ*himD*, a taxa de sobrevivência dos animais imunizados com 10^6 UFC dessas linhagens foi 66% (Mendes, 2008). Similarmente, animais duplamente imunizados com 10^6 UFC da linhagem Δ*fis* e desafiados com 10^4 UFC da linhagem selvagem 662ST, geraram uma taxa de 80% de sobrevivência (Oliveira *et al*., artigo em preparo). Por fim, como anteriormente mencionado, 100% dos animais duplamente imunizados com 10^8 UFC da linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* sobreviveram ao desafio com 10^7 UFC da linhagem selvagem 662ST. Portanto, o único caso em que houve proteção total de animais vacinados contra um desafio com dose letal da linhagem selvagem 662ST foi o descrito no presente trabalho, demonstrando o extremo potencial da linhagem 662STΔ*hupA*Δ*hupB* para atuação como vacina viva.

5.4. Colonização e persistência em órgãos

Conforme descrito na seção 4.8., 15 animais foram inoculados com 10^8 UFC da linhagem duplo mutante 662STΔ*hupA*Δ*hupB* e os órgãos dos animais foram extraídos e processados para a detecção das bactérias em determinados períodos. Os resultados estão apresentados na Tabela 07.

Tabela 07. Ensaio qualitativo de colonização e persistência da linhagem duplo mutante 662STΔ*hupA*Δ*hupB* em órgãos de camundongos BALB/c.

	Dia 03	**Dia 07**	**Dia 10**	**Dia 14**	**Dia 17**
Sangue	ausência	ausência	ausência	ausência	ausência
Placas de Peyer	presença	presença	ausência	ausência	ausência
Baço	presença	presença	presença	presença	presença

Para os tempos analisados, não foi detectada a presença de bactérias na corrente sanguínea, o que é um indicativo positivo, pois sugere que a multiplicação da linhagem duplo mutante na corrente circulatória é mínima, com um rápido "clearance" ou mesmo inexistente, característica essa importante em um vetor vacinal por prevenir reações adversas ao hospedeiro.

Também foi possível observar que a colonização nas placas de Peyer é breve, com duração de 07 dias, indicando que ocorre uma inflamação local passageira, já que as placas de Peyer são folículos linfóides presentes na mucosa e submucosa do intestino delgado, predominantemente no íleo.

No baço, a presença de bactérias foi confirmada para todos os tempos testados, sugerindo que tenha ocorrido uma infecção sistêmica e persistente, suficiente para induzir o sistema imune do hospedeiro, conforme verificado nos ensaios de desafio. Com o passar do tempo a quantidade de bactérias no baço foi se reduzindo (dados não mostrados), o que indica a eliminação bacteriana por parte do sistema imune. Esses resultados são positivos, pois já foi observado que um elevado número de bactérias no baço (cerca de 10^8-10^9 UFC) induz o óbito do hospedeiro (Mastroeni & Maskell, 2006).

5.5. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

5.5.1. Detecção de imunoglobulinas de mucosa IgA anti-*Salmonella*

Conforme preconizado por Srinivasan & McSorley (2006) a habilidade em induzir respostas IgA específicas a *Salmonella* é um importante aspecto a ser considerado no "design" de vacinas. Isto porque a presença de IgA anti-*Salmonella* na mucosa intestinal promove a apresentação de antígenos a células dendríticas nas placas de Peyer, além de ativar uma resposta imune adaptativa de modo mais eficaz em uma segunda infecção. Sendo assim, anticorpos IgA constituem a principal classe de anticorpos de mucosa produzidos por células locais, compondo a primeira linha de defesa imunológica contra infecções (Torres-Escobar *et al*., 2010).

A detecção dos anticorpos de mucosa IgA foi realizada a partir de amostras fecais de animais imunizados nos dias 0 e 14 com 10^8 UFC da linhagem duplo mutante Δ*hupA*Δ*hupB*. Foram amostrados materiais nos dias 14, 21, 28 e 35 após a segunda imunização. Cada ponto amostral foi constituído por material coletado de 05 animais. Um controle branco, com adição apenas de tampão, e um controle pré-imune, com amostras coletadas antes da imunização dos animais, foram utilizados.

Conforme indicado na figura 34, houve produção de anticorpos IgA pelo hospedeiro para os tempos analisados, detectados nas fezes dos animais imunizados. Nota-se que a resposta IgA é intensificada com o passar do tempo, atingindo seu pico 35 dias após a segunda imunização, data essa próxima ao desafio realizado nos ensaios de vacinação demonstrados na seção 5.3.4., onde

houve proteção de 100% dos animais, provavelmente com a contribuição da ação neutralizante dos anticorpos.

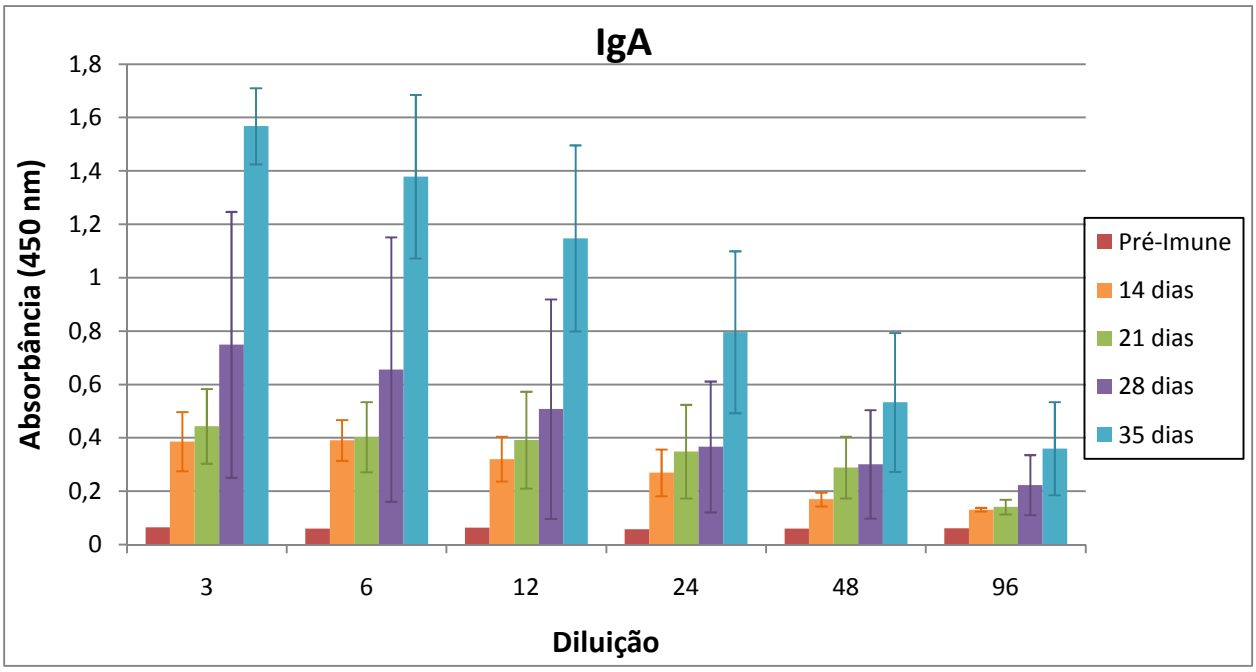


Figura 34. Detecção de anticorpos de mucosa IgA em amostras fecais de camundongos BALB/c imunizados com 2 doses da linhagem duplo mutante 662ST*ΔhupAΔhupB*. Foram consideradas somente as absorbâncias (eixo y) três vezes superiores ao controle pré-imune (colunas vermelhas). Cada coluna representa a média de amostras de 05 animais e as barras indicam o desvio padrão.

5.5.2. Detecção de imunoglobulinas séricas IgG anti-*Salmonella*

Os ensaios de ELISA para detecção de anticorpos IgG foram realizados a partir do soro de animais imunizados duas vezes com 10^8 UFC da linhagem ST662Δ*hupA*Δ*hupB*. As amostras para os ensaios imunoenzimáticos foram coletadas nos dias 14, 21, 28 e 35 após a segunda imunização, com 05 animais por amostragem. Um controle branco, sem adição do soro, apenas do tampão e um controle pré-imune, composto por amostras coletadas antes da imunização dos animais, foram utilizados.

Na figura 35 estão demonstrados os resultados dos ensaios imunoenzimáticos obtidos para os dias 28 e 35, já que 40% das amostras para os dias 14 e 21 não apresentaram absorbâncias três vezes superiores aos controles branco e pré-imune, conforme convencionado na seção 4.10. Dessa

forma, consideramos que a resposta IgG leva um tempo maior para se intensificar quando comparada à resposta IgA. Não obstante, da mesma forma que para os ensaios imunoenzimáticos de IgA, o pico de produção de IgG ocorreu 35 dias após a segunda imunização dos animais.

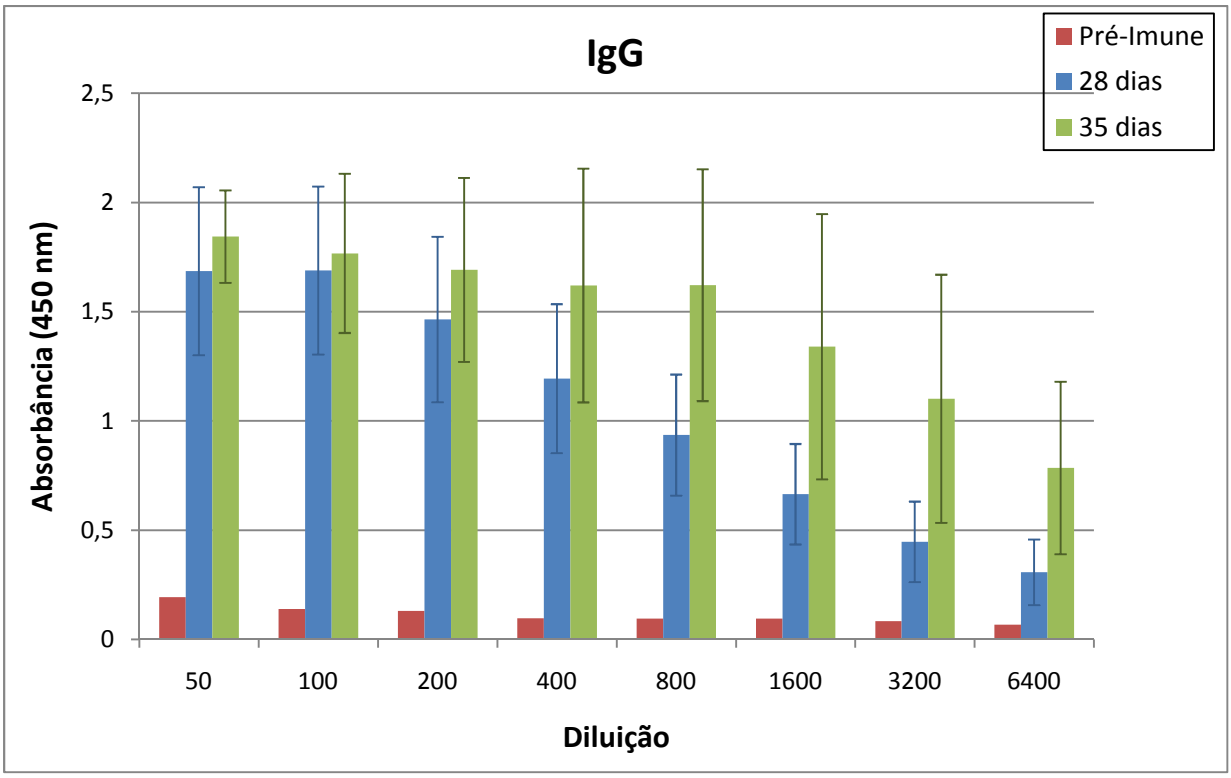


Figura 35. Ensaios imunoenzimáticos para a detecção de imunoglobulinas séricas IgG anti-*Salmonella*, presentes no soro de animais imunizados com 2 doses da linhagem recombinante 662STΔ*hupA*Δ*hupB*. Foram consideradas somente as absorbâncias (eixo y) três vezes superiores ao controle pré-imune (colunas vermelhas). Cada coluna representa a média de amostras de 05 animais e as barras indicam o desvio padrão.

Além de ser atenuada, conforme observado nos ensaios *in vivo*, a linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* também apresentou imunogenicidade, pois promoveu a produção tanto de anticorpos IgA quanto IgG pelo hospedeiro, além de ter protegido camundongos BALB/c contra o desafio com dose letal da linhagem selvagem (seção 5.3.4.). A eficácia em proteger o hospedeiro contra o desafio mesmo estando altamente atenuada, compõe ainda mais uma vantagem à linhagem 662STΔ*hupA*Δ*hupB*, pois essa elevada atenuação diminui a possibilidade da linhagem ser reatogênica, evitando indesejados efeitos colaterais no hospedeiro, como a bacteremia. Essa hipótese também foi

sugerida pelos resultados obtidos nos ensaios de colonização e persistência (seção 5.4.).

Em conjunto, todos os dados apresentados neste trabalho indicam o elevado potencial da linhagem duplo mutante 662STΔ*hupA*Δ*hupB* para atuar como vetor vacinal, além de corroborarem nossa hipótese inicial de que a deleção de um ou mais genes que codificam as subunidades da proteína HU resulta na atenuação da virulência de *S. enterica*.

Perspectivas futuras, geradas por este trabalho, compõe a análise proteômica de mutantes HU; a avaliação da produção de citocinas pelo hospedeiro, como IL-8 e TNFα, importantes na resposta à salmonelose; a realização de ensaios de proteção e desafio em diferentes modelos animais, como aves de postura comercial, que constantemente são alvos de *S. enterica* e a construção de mutantes nulos para os genes *hupA* e *hupB* em outras sorovariedades de *S. enterica*, como Typhi, abrindo portas para o estabelecimento de uma vacina mais eficiente contra a febre tifóide. Potenciais aplicações da linhagem Δ*hupA*Δ*hupB* incluem sua utilização como vetora vacinal, carreadora de antígenos heterólogos e como alternativa terapêutica antitumoral, levantando ainda a possibilidade de mutações ou inserções de outros genes nessa linhagem visando um melhor resultado, de acordo com o objetivo definido.

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho levou à construção de seis linhagens recombinantes de *Salmonella enterica*, sendo cinco delas compostas pela sorovariedade Typhimurium (662ST) e uma pelo sorotipo sem variação de fase flagelar, 4,[5],12:i:- (607STi). Para quatro das linhagens desenvolvidas (Δ*hha*, Δ*hupA*, Δ*hupB* e Δ*hupA*Δ*hupB*) não há relato de estudos de atenuação na literatura, sendo os dados aqui apresentados inéditos.

A atenuação da virulência foi verificada por inoculações intragástricas e intraperitoneais em camundongos BALB/c e todas as linhagens recombinantes, exceto Δ*dps*, apresentaram um determinado nível de atenuação em comparação à linhagem selvagem original, conforme inicialmente por nós hipotetizado.

A linhagem portadora da dupla mutação Δ*hupA*Δ*hupB* demonstrou elevado potencial para atuar como linhagem vacinal, assim como vetora vacinal no carreamento de antígenos heterólogos, pois revelou ser atenuada no modelo murino de infecção mesmo em doses elevadas, além de proteger os animais contra o desafio com dose letal da linhagem selvagem patogênica e induzir a produção de anticorpos pelo hospedeiro.

Como esse trabalho demonstrou a importância da proteína HU na virulência de *S. enterica*, outras perspectivas para trabalhos futuros compõe a análise proteômica de mutantes HU, a avaliação da produção de citocinas pelo hospedeiro, a realização de ensaios de proteção e desafio em diferentes modelos animais, a construção do duplo mutante para os genes *hupA* e *hupB* em outras sorovariedades com vários "backgrounds" genéticos de *S. enterica*, como Typhi, abrindo portas para o estabelecimento de uma vacina mais eficiente contra a febre tifóide. Outras potenciais aplicações incluem a inserção de antígenos heterólogos nessa linhagem recombinante,

visando desenvolver uma vacina viva multifatorial e a utilização dessa linhagem como terapia antitumoral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol*. (1999) 17:593-623.

Andrews-Polymenis HL, Ba AJ, Mccormick BA, Fang FC. Taming the Elephant: *Salmonella* Biology, Pathogenesis. *Infect. Immun.* (2010) 78(6):2356-2369.

Ansong C, Yoon H, Porwollik S, *et al*. Global Systems-Level Analysis of Hfq and SmpB Deletion Mutants in *Salmonella*: Implications for Virulence and Global Protein Translation. *Plos One*. (2009) 4(3):1-13.

Barbosa HR, Rodrigues MFA, Campos CC, Chaves ME, Nunes I, Juliano Y, Novo, NF. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. *J. Microbi Meth.* (1995) 22:39-50.

Berger M, Farcas A, Geertz M, *et al*. Coordination of genomics structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO reports*. (2009) 11(1):59-64.

Bi H, Sun L, Fukamachi T, Saito H, Kobayashi H. HU Participates in Expression of a Specific Set of Genes Required for Growth and Survival at Acidic pH in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol*. (2009) 58:443-448.

CDC. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary 2003. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2004.

Cheminay C, Hensel M. Rational design of Salmonella recombinant vaccines. *International Journal of Medical Microbiology*. (2008) 298:87-98.

Darby J, Sheorey H. Searching for *Salmonella*. *Australian family physician.* (2008) 37(10):806-810.

Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromossomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2000) 97(12):6640–6645.

De Groote MA, Testerman T, Xu Y, Stauffer G, Fang FC. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella* typhimurium. *Science.* (1996) 272:414–417.

Edwards PR, Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae.* (1972) 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn.

Elia CCS, Souza HSP. Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito. Rio de Janeiro: *Editora Atheneu*, 2001.

Fahlen TF, Mathur N, Jones BD. Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella* typhimurium. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. (2000) 28(1):25-35.

Fayolle C, Callaghan DO, Martineau P, Charbit A. Genetic Control of Antibody Responses Induced against Antigen Delivered by Recombinant Attenuated *Salmonella* typhimurium. *Infect. Immun.* (1994) 62(10):4310-4319.

Formal SB, Baron LS, Kopecko DJ, Washington O, Powell C, Life C. Construction of a potential bivalent vaccine strain: introduction of *Shigella sonnei* form I antigen genes into the *galE Salmonella* typhi Ty21a typhoid vaccine strain. *Infection and immunity*. (1981) 34(3):746-750.

Gemski P, Stocker BAD. Transduction by Bacteriophage P22 in Nonsmooth Mutants of *Salmonella* typhimurium. *J Bacteriol.* (1967) 93(5):1588-1597.

Guerra B, Laconcha I, Soto SM, Mendoza MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12: i :-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiology Letters*. (2000) 190:341-347.

Halsey TA, Gravdahl DJ, Fang FC, Libby SJ. The Ferritin-Like Dps Protein Is Required for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Oxidative Stress Resistance and Virulence. *American Society for Microbiology*. (2004) 72(2):1155-1158.

Higgins NP, Hillyard DR. Primary Structure and Mapping of the *hupA* Gene of *Salmonella* typhimurium. *Gene*. (1988) 170(12):5751-5758.

Ibarra JA, Steele-Mortimer O. *Salmonella* - the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular microbiology*. (2009) 11(11):1579-1586.

Kotton CN, Hohmann EL. Enteric Pathogens as Vaccine Vectors for Foreign Antigen Delivery. *Society*. (2004) 72(10):5535-5547.

Kubori T, Galán JE. *Salmonella* Type III Secretion-Associated Protein InvE Controls Translocation of Effector Proteins into Host Cells. *J Bacteriol.* (2002) 184(17):4699–4708.

Lu S, Manges AR, Xu Y, *et al*. Analysis of Virulence of Clinical Isolates of *Salmonella enteritidis In Vivo* and *In Vitro*. *American Society for Microbiology*. (1999) 67(11):5651-5657.

Marshall DG, Haque A, Fowler R, *et al.* Use of the stationary phase inducible promoters *spv* and *dps* to drive heterologous antigen expression in *Salmonella* vaccine strains. *Vaccine*. (2000) 18:1298-1306.

Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. *Salmonella*: Immune Responses and Vaccines. *The Veterinary Journal*. (2001) 161:132-164.

Mastroeni P, Maskell D. *Salmonella* infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects. Advances in Molecular and Cellular Microbiology 9. Cambridge: *Cambridge University Press*, 2006.

McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D, Koronakis V, Road TC. *Salmonella* takes

control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology*. (2009) 12(1):117-124.

Mendes GMT. Construção e caracterização de linhagens de *Salmonella enterica* mutantes nos genes de IHF (Integration Host Factor). (2008). Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

Ohl ME, Miller SI. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual review of medicine*. (2001) 52:259-74.

Oliveira AF, Ferraz LC, Brocchi M. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. *Microbes and Infection*. (2007) 9:382-390.

Rosenberger CM, Scott MG, Gold MR, Hancock REW, Finlay BB. *Salmonella* typhimurium Infection and Lipopolysaccharide Stimulation Induce Similar Changes in Macrophage Gene Expression. *J. Immunol*. (2000) 164:5894-5904.

Sales AIL, Caracterizações fenotípicas e genotípicas de amostras monofásicas de *S. enterica* I 4,[5],12:i:-. (2007) Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

Salyers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. Washington: *ASM Press* 2nd. Ed., 2002.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. NY: *Cold Spring Harbor* 2nd Ed., 1989.

Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology*. (2004) 4:953-964.

Santiviago CA, Fuentes JÁ, Bueno AM *et al*. The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Molecular Microbiology.* (2002) 46(3):687-698.

Schechter LM, Jain S, Akbar S, Lee CA. The Small Nucleoid-Binding Proteins HNS, HU and Fis Affect *hilA* Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *American Society for Microbiology*. (2003) 71(9):5432-5435.

Silphaduang U, Mascarenhas M, Karmali M, Coombes BK. Repression of Intracellular Virulence Factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT Nucleoid-Associated Proteins. *American Society for Microbiology*. (2007) 189(9):3669-3673.

Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K, Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella* typhimurium. *Molecular Microbiology*. (2007) 63:193-217.

Soyer Y, Switt AM, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ *et al. Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an Emerging *Salmonella* Serotype That Represents Multiple Distinct Clones. *Journal of clinical microbiology*. (2009) 47(11):3546-3556.

Srinivasan A, McSorley SJ. Activation of *Salmonella*-specific immune responses in the intestinal mucosa. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (2006) 54:25-31.

Switt AM, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne pathogens and disease*. (2009) 6(4):407-415.

Tindall BJ, Grimont PaD, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. (2005) 55:521-524.

Torres-Escobar A, Juárez-rodríguez MD, Branger CG, Curtiss III, RC. Evaluation of the humoral

immune response in mice orally vaccinated with live recombinant attenuated *Salmonella enterica* delivering a secreted form of *Yersinia pestis* PsaA. *Vaccine.* (2010) 28:5810-5816.

Trebichavský I, Splíchal I, Splíchalová A. Innate immune response in the gut against *Salmonella*. *Folia microbiologica*. (2010) 55(3):295-300.

Welkos S, O'Brien A. Determination of Median Lethal and Infectious Doses in Animal Model Systems. *Methods in Enzymology.* (1994) 235:29-39.

Yoon H, Lim S, Heu S, Choi S, Ryu S. Proteome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *fis* mutant. *FEMS Microbiology Letters*. (2003) 226(2), 391-396.

Zhang X, Kelly SM, Bollen W, Iii RC. Protection and immune responses induced by attenuated *Salmonella* typhimurium UK-1 strains. *Microbial Pathogenesis*. (1999) 26:121-130.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi

http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

8. APÊNDICE

I. Os experimentos realizados em animais neste trabalho foram autorizados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (página iv).

II. Os experimentos foram conduzidos em laboratório com autorização de Biossegurança nível 2 (CNTBio).

III. Os dados aqui apresentados foram recentemente submetidos ao banco de patentes pela Agência de Inovação da Unicamp (Inova) para proteção intelectual dos resultados (Código Interno 455 Vetor Vacinal).

IV. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADOS

1) Meio Luria Bertani (LB)

Componentes	**Quantidade**
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio	10 g
Triptona	10 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 ºC durante 20 minutos.

2) Meio Luria Bertani Ágar (LA)

Para o preparo do meio LA foi adicionado 1,5% de ágar bacteriológico em meio LB. Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 ºC durante 20 minutos.

3) Meio LB semi sólido

Para o preparo do meio LB semi-sólido foi adicionado 0,6% a 0,8% de ágar bacteriológico em meio LB. Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 ºC durante 20 minutos.

4) MacConkey

O meio MacConkey possui formulação pronta (Oxoid®). Para cada 100 mL de água destilada foram adicionadas 5,15 g da formulação e o meio foi autoclavado a 121 ºC durante 20 minutos.

5) Meio Mínimo (M9)

Componentes	**Volume**
Sais M9 (5 x)	200 mL
$MgSO_4$ (1M) *	2 mL
$CaCl_2$ (1 M) *	0,1 mL
Glicose (1 M) **	20 mL
Água destilada	750 mL

Após o preparo, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 ºC durante 20 minutos.

* Solução preparada separadamente e autoclavada a 121 ºC durante 20 minutos.

** A solução de glicose foi esterilizada por filtração a 0, 22 μm (Millipore®).

6) Sais M9 (5 x)

Componentes	**Quantidade**
$Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$	64 g
KH_2PO_4	15 g
NaCl	2,5 g
NH_4Cl	5 g
Água destilada	1000mL

Após dissolução dos sais em água, a solução foi autoclavada a 121 ºC durante 20 minutos.

7) Glicose 1M

Componentes	**Quantidade**
D-Glicose	18 g
Água destilada q.s.p	100 mL

A solução foi filtrada em filtros de 0,22 µm (Millipore®) e estocada a 4 ºC.

8) Meio SS (*Salmonella-Shigella*)

O meio SS possui formulação pronta (DifcoTM, BD®). Para o preparo do meio, 6 g da formulação foram adiconadas a 100 mL de água destilada. A solução foi homogeinizada por aquecimento em microondas e vertida sobre placas de Petri. O meio SS dispensa autoclavagem.

9) Meio SOC

Componentes	**Quantidade**
Triptona	2 g
Extrato de levedura	0,5 g
NaCl	0,05 g

Após a dissolução dos componentes em 90 mL de água destilada, foram adicionados 1 mL de KCl (250 mM) e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH (5 N). Água destilada foi adicionada em uma quantidade suficiente para o volume final de 100 mL.

Este meio foi esterilizado por autoclavagem a 121º C por 20 minutos. Pouco antes do uso foram adicionados 500 µL de $MgCl_2$ (2 M) e 2 mL de glicose (1 M).

10) Ampicilina

A solução estoque foi preparada para a concentração de 50 mg/mL em água milliQ autoclavada e a solução foi esterilizada por filtração a 0,22 µm (Millipore®). A solução foi estocada a -20 °C e a concentração final adotada para uso foi 100 µg/mL.

11) Cloranfenicol

A solução estoque foi preparada a 34 mg/mL em etanol. A solução foi estocada a -20 °C e protegida da luz. A concentração adotada para uso foi 25 µg/mL.

12) Tampão TBE (5 x)

Componentes	**Quantidade**
Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA (0,5 M)	20 mL
Água destilada q.s.p	1000 mL

Os componentes foram dissolvidos em água e o pH ajustado para 8,3. A solução foi autoclavada por 20 minutos a 121 °C e armazenada a 4 °C.

13) Gel de agarose 1 %

Componentes	**Quantidade**
Agarose	0,3 g
TBE (5 x)	30 mL

A solução foi homogeneizada por aquecimento no microondas e vertida na cuba de eletroforese para solidificação.

14) Tampão de corrida ("loading buffer") (6 x)

Componentes	**Quantidade**
Azul de bromofenol	0,25 g
Xileno cianol	0,25 g
Sacarose	40 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

A solução foi homogeneizada e armazenada a 4 °C.

15) Soluções para extração de DNA genômico

Solução I

Componentes	**Quantidade**
Tris-HCl (1M pH 8,0)	0,5 mL
EDTA (0,5M)	1 mL
Glicose	2 g
Água deionizada q.s.p.	10 mL

A solução foi homegeneizada, filtrada a 0,22 μm (Millipore®) e estocada a 4 ºC.

Solução II

Componentes	**Quantidade**
NaCl (5 M)	0,2 mL
Sarcosil ($C_{15}H_{28}NNaO_3$)	0,2 g
Água deionizada q.s.p.	20 mL

A solução foi homegeneizada, autoclavada e estocada a 4 ºC.

Solução de fenol clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1)

Componentes	**Quantidade**
Fenol	25 mL
Clorofórmio	24 mL
Álcool Isoamílico	1 mL

Solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1)

Componentes	**Quantidade**
Clorofórmio	24 mL
Álcool Isoamílico	1 mL

16) Glicerol 10%

Componentes	**Volume**
Glicerol	100 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi homegeneizada, autoclavada e estocada a 4 ºC.

17) Glicerol 40%

Componentes	**Volume**
Glicerol	400 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi homegeneizada, autoclavada e estocada a 4 ºC.

18) L-Arabinose (1 M)

Componentes	**Quantidade**
L-arabinose	150,13 g
Água milliQ q.s.p.	1000 mL

A solução foi homegeneizada, filtrada a 0,22 μm (Millipore®) e estocada a -20 ºC.

19) Etanol 70%

Componentes	**Volume**
Etanol Absoluto	70 mL
Água destilada	30 mL

A mistura foi homogeneizada e estocada a 4º C.

20) Metil Viologen 1 M (paraquat)

Componentes	**Quantidade**
Metil Viologen	2,57 g
Água destilada q.s.p.	10 mL

A solução foi homegeneizada, filtrada a 0,22 μm (Millipore®) e estocada a 4 ºC.

21) Nitrito de Sódio (1 M)

Componentes	**Quantidade**
$NaNO_2$	6,9 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi homegeneizada, filtrada a 0,22 μm (Millipore®) e estocada a 4 ºC.

22) Meio ASN

Primeiramente foi preparado o meio LB e o pH foi ajustado para 5 com HCl. Foram adicionados 30 μL de nitrito de sódio (1 M) para cada 2 mL de meio.

23) Tampão PBS

Componentes	**Quantidade**
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH_2PO_4	0,24 g
Na_2HPO_4	1,44 g
Água destilada	800 mL

Os sais foram dissolvidos em água e o pH foi ajustado para 7,4 pela adição de HCl. O volume foi completado para 1000 mL e a solução foi autoclavada a 121 °C durante 20 minutos. A solução foi estocada à temperatura ambiente.

24) Solução Salina

Componentes	**Quantidade**
NaCl	0,85 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

A solução foi homegeneizada, autoclavada a 121 °C por 20 minutos e estocada à temperatura ambiente.

25) PBS 1mM PMSF 1% BSA

Componentes	**Quantidade**
PBS	20 mL
PMSF (100 mM)	200 µL
BSA	0,2 g

A solução de PMSF e a proteína BSA foram adicionados ao PBS e homogeneizados em vortex.

26) PMSF (100 mM)

Componentes	**Quantidade**
PMSF	17,4 mg
Isopropanol	1 mL

O PMSF foi dissolvido em isopropanol e a solução estocada a -20 °C.

27) PBS-T

Componentes	**Quantidade**
PBS	100 mL
Tween 20®	50 µL

A solução foi homogeneizada em agitador e preparada pouco antes do uso.

28) PBS 0,025% Tween 20® 0,1% BSA

Componentes	**Quantidade**
PBS	100 mL
Tween 20®	25 µL
BSA	0,1 g

A solução foi homogeneizada em agitador e preparada pouco antes do uso.

29) PBS 0,05% Tween 20® 0,1% BSA

Componentes	**Quantidade**
PBS	100 mL
Tween 20®	50 µL
BSA	0,1 g

A solução foi homogeneizada em agitador e preparada pouco antes do uso.

30) Solução Bloqueadora

Componentes	**Quantidade**
PBS	100 mL
Tween 20®	50 µL
BSA	1 g

A solução foi homogeneizada em agitador e preparada momentos antes do uso.

31) Tampão Carbonato de sódio (0,5M)

Solução A: Carbonato de sódio (0,5M)

Componentes	**Quantidade**
Na_2CO_3	5,3 g
Água deionizada	100 mL

Solução B: Bicarbonato de sódio (0,5M)

Componentes	**Quantidade**
$NaHCO_3$	4,2 g
Água deionizada	100 mL

A solução A foi misturada à solução B para obter o pH 9,6. O tampão foi conservado a 4 ºC.

32) Tampão Fosfato citrato

Componentes	**Quantidade**
Ácido Cítrico	10,2 g
Na_2HPO_4	14,6 g
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

O pH foi ajustado para 5,0 com ácido cítrico 0,2M e o tampão foi acondicionado a 4 ºC.

33) Substrato para ELISA

Componentes	**Quantidade**
OPD	10 mg
Tampão fosfato citrato	25 mL
Água oxigenada	10 µL

A solução foi homogeneizada em agitador e preparada pouco antes do uso.