

**Marcos Henrique de Moraes**

**“Construção de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* Enteritidis: avaliação do potencial imunogênico e protetor”**

Campinas  
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARCOS HENRIQUE DE MORAES

**“CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS ATENUADAS DE  
SALMONELLA ENTERICA ENTERITIDIS: AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL IMUNOGÊNICO E PROTETOR”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
MARCOS HENRIQUE DE MORAES  
[assinatura]  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

CAMPINAS,  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

M791c Moraes, Marcos Henrique de, 1986-  
Construção de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* Enteritidis: avaliação do potencial imunogênico e protetor / Marcos Henrique de Moraes. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

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

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Construction of attenuated *Salmonella enterica* Enteritidis strains: evaluation of its immunogenic and protective potential

**Palavras-chave em Inglês:**

*Salmonella enterica*

Vaccines

*Salmonella* - Pathogenesis

**Área de concentração:** Microbiologia

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Marcelo Brocchi [Orientador]

Alessandro dos Santos Farias

Marilis do Valle Marques


**Data da defesa:** 04-06-2012

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 04 de junho de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador)

  
Assinatura

Profª. Dra. Marilis do Valle Marques

  
Assinatura

Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias

  
Assinatura

Profª. Dra. Ana Deckmann

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## Agradecimentos

Primeiro agradeço aos meus pais, pelo genoma que me deram e pelo ambiente que me proporcionaram onde eu pude ser feliz, também agradeço a minha única irmã por ter sido minha amiga nestes últimos 25 anos.

Pela compreensão do significado mais íntimo da amizade, eu agradeço ao amor da minha vida, Ariana Zilioti.

Pelo companheirismo sem igual eu agradeço ao “Triunvirato +1”: Iuri, Leonardo, Mainara e Marília, sem ordem de importância.

Por ter sido muito mais que uma colega eu agradeço a Marcela Medici, que se tornou tão importante neste último ano.

Cris, obrigado por ter sido um amigo tão próximo nestes últimos meses tão turbulentos.

Pela orientação e pelas oportunidades que vão definir minha vida profissional eu agradeço ao meu orientador Marcelo Brocchi.

Agradeço a Aline por ter sido uma segunda orientadora.

Por ter me ensinado os primeiros passos na biologia eu agradeço a Odalys.

Aos *brothers* do lab, Igor e Guilherme eu agradeço pelas paçocas e cervejas, regadas de companheirismo. Gatinhas: Jéssica, Bruna, Meire e Dri, obrigado por terem tornado tudo mais agradável. Novas gatinhas: Cati, Camila e Tamires, pena que tivemos pouco tempo de convívio, boa sorte para vocês.

*Thank you very much, Andreas Baumler, Sean, Jason and Parameth for the good times and everything that I learned in US.*

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro.

*The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not “Eureka” but “That’s funny...”*

Isaac Asimov (1920-1992)

## Resumo

*Salmonella enterica* é uma bactéria Gram-negativa classificada em diferentes sorovariedades que podem causar desde gastroenterites a infecções sistêmicas. A sorovariedade Enteritidis é predominante nos casos de salmonelose em humanos, tendo produtos derivados do frango como principal fonte de infecção. Uma forma de se controlar infecções por Enteritidis é através da vacinação de frangos, uma estratégia já utilizada, porém com limitações, pois estas vacinas muitas vezes são inativadas ou possuem origem de atenuação desconhecida. Outra limitação é a falta de estudos específicos para Enteritidis, pois maior parte dos estudos feitos com *S. enterica* se baseiam na sorovariedade Typhimurium. Um alvo para a construção de linhagens vacinais são os genes codificadores de *Nucleoid Associated Proteins* que são proteínas que se ligam ao DNA alterando sua topologia, afetando a transcrição global dos genes. Neste projeto realizamos a construção de mutantes nulos de *S. enterica* Enteritidis para alguns destes genes com a finalidade de avaliar seu potencial vacinal e papel na patogênese. As linhagens foram testadas no modelo de infecção sistêmica e de inflamação do ceco. No modelo de infecção sistêmica, a linhagem selvagem e  $\Delta fis$  se apresentaram virulentas ou pouco atenuadas enquanto as linhagens  $\Delta ihfA$  e  $\Delta ihfB$  foram atenuadas. Os testes de proteção foram feitos com os dois mutantes atenuados que induziram 100% de proteção. A linhagem selvagem e o mutante pouco atenuado induziram inflamação neste modelo, mas o mutante induziu de forma mais amena. Análises morfométricas futuras irão elucidar com mais clareza o papel deste gene na inflamação. Este projeto teve como principais realizações: (i) a construção de duas linhagens atenuadas, com alto potencial para uso vacinal e (ii) abriu novas possibilidades para o estudo nas NAP's durante a patogênese de diferentes sorovariedades.

## Abstract

*Salmonella enterica* is a Gram-negative bacterium classified in different serovars which may cause gastroenteritis and systemic infections. The serovar Enteritidis is responsible for most of the cases of salmonellosis in humans and have poultry based products as its main source of infection. Poultry vaccination has been an effective strategy to control Enteritidis infections and it's already applied, but with limitations, because the vaccines sometimes are inactivated or are attenuated by unknown mechanisms. Another limitation is the lack of studies specific to Enteritidis, most of the research related to *S. enterica* is based on serovar Typhimurium. A target to vaccine strains development are the genes members of the group called Nucleoid Associated Proteins, which are proteins that bind to DNA changing its topology and affecting global gene transcription. In this project, we constructed *S. enterica* null mutants to some of these genes aiming the evaluation of their vaccine potential and role in pathogenesis. The strains were tested with the systemic infection model and cecum inflammation. In the systemic infection model, the wild and  $\Delta fis$  strain were virulent while the  $\Delta ihfA$  and  $\Delta ihfB$  were attenuated. The protection essays were made with attenuated mutants and provided 100% of protection. The wild and  $\Delta fis$  strains lead to inflammation in this model, but the mutant induced a mild inflammation, morfometrics analysis will clarify the role of this gene in inflammation. This project have as main outcomes: (i) the construction of strains,  $\Delta ihfA$  and  $\Delta ihfB$ , with good potential to be used as vaccines; (ii) New possibilities to the role of *fis* gene during inflammation.



## Lista de Abreviaturas

Bla – Betalactamase

BSA – Albumina Sérica Bovina

*cat* – Cloranfenicol Acetil Transferase

cm – Centímetro

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato

OD – Densidade Óptica

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

*fis* – *Factor for Inversion*

FRT – *FLP Recognition Site*

IgG – Imunoglobulina G

*ihf* – *Integration Host Factor*

Kb - Kilobase

LB – Meio Luria Bertani

LB CM – Meio Luria Bertani com cloranfenicol

LB AMP – Meio Luria Bertani com ampicilina

LB CM AMP – Meio Luria Bertani com ampicilina e cloranfenicol

MALT – Tecido Linfoide Associado a Mucosas

mg – Miligrama

MgM – Meio Magnésio Mínimo

ml – Mililitro

NAPs – Proteínas Associadas ao Nucleóide

pb – Pares de Bases

PBS – Tampão Salina Fosfato

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

RPM – Rotações Por Minuto

SE- *Salmonella enterica* Enteritidis

SDS – Dodecil sulfato de sódio

ST – *Salmonella enterica* Typhimurium

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFP – Unidade Formadora de Placa

WHO – *World Health Organization*

°C – Graus Celsius

µg – micrograma

µl – microlitro

µM – Micrômetro

µM – microMolar

# Índice Geral

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas .....	viii
Índice Geral .....	x
Índice de Figuras.....	xii
1. Introdução .....	1
1.1. <i>Salmonella enterica</i> .....	1
1.2. Enteritidis, uma sorovariedade emergente .....	2
1.3. Transmissão de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis.....	4
1.4. Vacinas contra <i>S. enterica</i> .....	5
1.5. O Nucleóide Bacteriano .....	8
1.6. Patogenicidade.....	9
2. Objetivos .....	13
3. Material e Métodos .....	14
3.1. <i>Primers</i> , plasmídios e linhagens bacterianas.....	14
3.4.1. Linhagens bacterianas selecionadas para mutagênese .....	16
3.4.2. Mutagênese .....	17
3.4.3. <i>Primers</i> utilizados para gerar os cassetes de recombinação .....	18
3.4.4. Construção do cassete de recombinação por PCR.....	18
3.4.5. Transformação das linhagens de <i>S. enterica</i> com o plasmídio pKD46.....	18
3.4.6. Troca alélica dos genes <i>ihfA</i> e <i>ihfB</i> pelo cassete de recombinação .....	18
3.4.7. Confirmação das mutações em <i>ihfA</i> , <i>ihfB</i> e <i>fis</i> por PCR.....	19
3.4.8. Transdução com bacteriófago P22 .....	20
3.5. Curva de crescimento <i>in vitro</i> .....	21
3.6.1. Determinação da Dose Letal (DL50) por via oral em camundongos.....	21
3.7. Quantificação de anticorpos.....	23
3.7.1. Coleta e processamento de sangue.....	23
Figura 4. Esquema dos tratamentos e coletas para quantificação de anticorpos.....	24
3.7.2. Detecção de anticorpos séricos .....	24
3.7.3. Coleta e processamento de material fecal para a detecção de IgA de mucosa .....	25
3.7.4. Detecção de IgA .....	25

3.7.5.	Obtenção do extrato antigênico de SE PT4 .....	25
3.8.1.	Indução de inflamação.....	26
3.8.2.	Coleta e fixação.....	26
3.8.3.	Processamento e coloração.....	27
4.	Resultados.....	28
4.1.	Deleção dos genes <i>ihfA</i> , <i>ihfB</i> e <i>fis</i> .....	28
4.1.1.	Extração dos plasmídios .....	28
4.1.2.	Amplificação do cassete de deleção .....	28
4.1.3.	Construção dos mutantes .....	28
4.1.5.	Remoção do cassete de resistência .....	31
4.1.6.	Remoção do cassete de resistência para os mutantes IHF.....	33
4.2.	Plasmídio de Virulência.....	34
4.3.	Curva de Crescimento .....	35
4.4.	Determinação da Dose Letal Média (DL50) .....	36
4.5.	Desafio e Proteção .....	38
4.6.	Detecção de Ig's por ELISA.....	40
4.7.	Modelo de inflamação.....	42
5.	Discussão.....	45
6.	Conclusão.....	52
7.	Apêndice 1: Atenuação regulada.....	53
7.1.	Plasmídios da atenuação regulada.....	53
7.2.	Marcador araBAD.....	59
8.	Bibliografia .....	60

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema representando as etapas e sua ordem na construção das linhagens recombinantes de <i>S. enterica</i> .....	14
<b>Figura 2:</b> Esquema do experimento para determinação da DL50.....	22
<b>Figura 3:</b> Esquema representando os dois tratamentos de proteção. A; uma dose da linhagem atenuada, B; duas doses das linhagens atenuadas.....	23
<b>Figura 4.</b> Esquema dos tratamentos e coletas para quantificação de anticorpos.....	24
<b>Figura 5:</b> Esquema representando o modelo experimental para indução da inflamação no ceco.....	26
<b>Figura 6:</b> Deleção dos genes <i>fis</i> , <i>ihfA</i> e <i>ihfB</i> .....	29
<b>Figura 7:</b> Título do fago P22 obtido para diferentes mutantes de <i>S. enterica</i> Enteritidis comparado a <i>S. enterica</i> Typhimurium, <i>w</i> representa a linhagem selvagem e $\Delta$ os mutantes para cada gene.....	31
<b>Figura 8:</b> PCR confirmando a remoção do gene de resistência no mutante $\Delta$ <i>fis</i> .....	32
<b>Figura 9:</b> Gel de agarose 1%, mostrando o plasmídeo pCP20 digerido com XhoI e fragmentos correspondendo aos <i>amplicons</i> de <i>ihfA</i> e <i>ihfB</i> .....	34
<b>Figura 10.</b> Detecção do plasmídeo de virulência de <i>S. enterica</i> Enteritidis selvagens ( <i>w</i> ) e mutantes nulos ( $\Delta$ ) para <i>fis</i> , <i>ihfA</i> e <i>ihfB</i> .....	35
<b>Figura 11:</b> Curva de crescimento das linhagens mutantes e selvagens.....	36
<b>Figura 12:</b> Gráficos representando a sobrevivência dos animais após o desafio durante 28 dias.....	39
<b>Figura 13:</b> Gráficos representando a sobrevivência dos animais após o desafio durante 28 dias.....	40
<b>Figura 14:</b> Quantificação de IgG totais e IgG2a para os animais tratados com apenas PBS (controle negativo) e com as linhagens atenuadas.....	41
<b>Figura 15:</b> Ceco de camundongos C57B/6 tratados com Enteritidis ou PBS (PBS) no modelo de gastroenterite.....	42
<b>Figura 16:</b> Comparação entre tratamento negativo (A) e tratamento com SE PT4 (B)....	43
<b>Figura 17:</b> Corte do ceco tratado com PT4 <i>w</i> mostrando descamação.....	44
<b>Figura 18:</b> Corte do ceco tratado com PT4 <i>w</i> mostrando células do sistema imune.....	44

# 1. Introdução

## 1.1. *Salmonella enterica*.

*Salmonella* sp é um gênero de bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Mastroeni e Maskell, 2006). Este gênero é classificado sorologicamente pela identificação de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Atualmente, são conhecidas mais de 2500 sorovariedades de *S. enterica* (Poppof *et al.*, 2004).

As sorovariedades de *S. enterica* patogênicas podem causar infecções com diferentes gravidades incluindo infecções assintomáticas, gastroenterites localizadas na mucosa intestinal até infecções sistêmicas, dependendo da sorovariedade bacteriana e do tipo de hospedeiro envolvidos (Fierer e Guiney, 2001; Bäumler *et al.*, 1998).

*S. enterica* Typhi é a sorovariedade responsável pela febre tifóide, uma infecção sistêmica grave e restrita a humanos (Guzman *et al.*, 2006). *S. enterica* Choleraesuis causa infecções sistêmicas graves, principalmente em suínos (Mastroeni e Maskell, 2006; Salyers e Whitt, 2002; Fierer e Guiney, 2001). *S. enterica* Dublin é mais relacionada a bovinos (Mastroeni e Maskell, 2006; Fierer e Guiney, 2001). *S. enterica* Typhimurium e Enteritidis são causas comuns de gastroenterites em humanos, mas podem estar associadas a infecções extra-intestinais (Mastroeni e Maskell, 2006). Os mecanismos envolvidos na especificidade da relação patógeno-hospedeiro ainda não são completamente elucidados, mas uma relação na redução do genoma e especificidade do sorovar já foi estabelecida ( Mastroeni e Maskell, 2006).

Em camundongos, *S. enterica* Typhimurium causa um tipo de infecção muito semelhante à febre tifóide humana. Desta forma, a infecção de camundongos BALB/c com essa sorovariedade é o modelo murino mais usado para a infecção sistêmica por *S. enterica*.

A Organização Mundial de Saúde estima a ocorrência de 16 a 33 milhões de casos de febre tifóide no mundo, com 500 a 600 mil fatalidades anuais (<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>). Nos Estados Unidos, são notificados aproximadamente 1,4 milhões de infecções anuais causadas por sorovariedades de *S. enterica* não Typhi, resultando em mais de 500 mortes anuais (<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>; Mead *et al.*, 1999).

Atualmente a salmonelose representa ainda um grave problema de saúde pública, devido sua alta incidência e gravidade, que leva a um grande prejuízo econômico e sofrimento humano (Woc-Colburn e Bobak, 2009; Boyle *et al.*, 2007; Coburn *et al.* 2007; Figueroa-Ochoa e Verdugo-Rodrigues, 2005; Graham, 2002).

## **1.2. Enteritidis, uma sorovariedade emergente**

Nos últimos 30 anos houve um aumento dos casos de salmonelose nos países desenvolvidos (Humphrey, 1994; Riemann *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2000), que se disseminou pelo mundo atingindo níveis epidêmicos.

Este surto tem sido associado com o aumento de casos da sorovariedade *S. enterica* Enteritidis, principalmente com o fagotipo PT4. Por exemplo, na Inglaterra e no País de Gales, que possuem um padrão de infecção humana muito próxima do resto da Europa Ocidental, foram diagnosticados cerca de 10000 casos de salmonelose em 1981, com menos de 5% destes casos devido a *S. enterica* Enteritidis, para um pico de 33000 casos em 1997, sendo que 65% destes casos foram causados por *S. enterica* Enteritidis e destes 80% eram do fagotipo PT4 (Mastroeni e Maskell, 2006).

Nos Estados Unidos e na Europa o aumento dos casos de salmonelose causada por *S. enterica* Enteritidis ocorreu no início da década de 80, o mesmo fenômeno foi observado no Brasil 10 anos depois. O estudo realizado por Tavechio *et al.* (1996) utilizando amostras de infecção humana e material não humano, revelou que em 1991 1,2% dos isolados de *S. enterica* eram da sorovariedade Enteritidis, este número aumentou exponencialmente, atingindo o valor de 64,9% em 1995, sinalizando que o Brasil também fazia parte deste quadro epidemiológico.

Uma das causas apontadas para esta mudança na frequência de sorovariedades foi a erradicação virtual das sorovariedades Gallinarum e Pullorum na Europa e Estados Unidos no fim dos anos 70 (Mastroeni e Maskell, 2006). Estas sorovariedades raramente causam doenças em humanos, porém em frangos causam uma infecção sistêmica semelhante à febre tifóide, causando grande prejuízo econômico (Bullis, 1977), o que levou a um grande esforço para combate com a utilização de vacinas e sacrifício dos animais doentes. Com a erradicação das sorovariedades típicas de frangos, *S. enterica* Enteritidis passou a ocupar este nicho ecológico gerando uma fonte de infecção em humanos (Rabsch *et al.*, 2000).

Outro fator sugerido para a expansão da sorovariedade Enteritidis é a aquisição, por uma nova linhagem, a habilidade de invadir e permanecer no frango (Rabsch *et al.*, 2001). Na Austrália, a sorovariedade Enteritidis possui os níveis pré-epidêmicos da Europa e EUA, e provavelmente possui linhagens distintas destes locais, o que reforça a hipótese de que a expansão foi causada pelo surgimento de uma nova linhagem (Cox, 1995)

É provável que todos estes fatores, em convergência, sejam responsáveis pela epidemia internacional causada por *S. enterica* Enteritidis.



### **1.3. Transmissão de *Salmonella enterica* Enteritidis**

*Salmonella* em geral pode ser transmitida por vários produtos de origem animal, como laticínios e carnes. Os surtos relacionados a estes alimentos possuem em sua origem deficiências nas condições de higiene que podem ocorrer desde a produção até a forma de ser servido (Mastroeni e Maskell, 2006).

Estes surtos poderiam ser reduzidos sanando as questões de higiene e saneamento, porém a transmissão por produtos de origem aviária, principalmente ovos é mais difícil de ser evitada e justamente é essa a origem de infecção mais presente. De 1998 a 2002 na Inglaterra e País de Gales, dos 149 surtos de salmonelose com origem identificada, 69 tiveram ovos de galinha como veículo de infecção (Mastroeni e Maskell, 2006)

Uma das principais características desta atual epidemia de salmonelose é que a bactéria pode ser isolada do conteúdo de ovos limpos, secos, intactos e produzidos comercialmente. Este é um dos principais fatores para a distribuição e manutenção de *S. enterica* Enteritidis em escala global (Mastroenie e Maskell, 2006).

Diferentes linhas de estudos apontam que a contaminação dos ovos ocorre nos órgãos reprodutores durante sua formação ao invés de ocorrer após a postura. Na maior parte destes estudos as bactérias são recuperadas no albúmen, indicando que o órgão reprodutor que está sendo colonizado é o istmo, responsável pela produção deste conteúdo do ovo, porém ainda é muito discutido se há especificidade na colonização dos órgãos reprodutores (Gantois *et al.*, 2009).

Curiosamente o albúmen que está sendo colonizado pelas bactérias é o conteúdo do ovo que possui maior quantidade de antimicrobianos. Os dois mais conhecidos são a lisozima, uma

muramidase capaz de abrir poros na parede celular bacteriana (Hughey e Johnson, 1987) e a ovotransferrina que pode agir como um bacteriostático quelando o ferro disponível (Mayes e Takeballi, 1983) e também, através da interação direta com a membrana celular que leva a perda de funções deste componente celular (Ibrahim *et al.*, 1998; Ibrahim *et al.*, 2000)

Diferentes fatores genéticos e fisiológicos têm sido relacionados com a capacidade de *S. enterica* Enteritidis a sobreviver no ovo em formação. Durante a exposição ao conteúdo do ovo, há um aumento na expressão do gene *rfbH*, que atua na síntese do antígeno O. Também foi relatado que o mutante  $\Delta rfbH$  morre imediatamente após ser inoculado no albúmen, enquanto a linhagem selvagem sobrevive por até 24 horas (Gantois *et al.*, 2009).

Em um estudo utilizando mutagênese por transposon, foi identificado que a resistência de *S. enterica* Enteritidis ao albúmen está relacionada à integridade da parede celular e metabolismo de aminoácido e ácidos nucleicos (Clavijo *et al.*, 2006).

Ainda há muitas lacunas no conhecimento sobre como *S. enterica* Enteritidis é capaz de invadir e sobreviver em ovos. Como diversos genes devem estar envolvidos nesta habilidade, novos estudos genéticos e o sequenciamento do genoma das principais linhagens relacionadas a infecção, principalmente PT4, irão ajudar a elucidar esta questão.

#### **1.4. Vacinas contra *S. enterica***

Devido ao aumento dos casos de salmonelose tendo principalmente o ovo de galinha como fonte da infecção, há um aumento no apelo pelo desenvolvimento de vacinas, principalmente voltadas para uso veterinário. Essas vacinas podem ser inativadas ou atenuadas. Para o primeiro tipo, a vacina é composta por bactérias mortas, para o segundo tipo a composição da vacina são bactérias vivas, porém atenuadas e incapazes de desencadear uma

doença.

Sendo *Salmonella* um parasita intracelular facultativo, a ativação da resposta imune mediada por células é fundamental para seu controle e eliminação pelo hospedeiro. Embora vacinas inativadas possam gerar uma resposta mediada por células, a resposta é principalmente humoral (Thatte *et al.*, 1995; Okamura *et al.* 2004), o que se torna uma desvantagem para serem utilizadas no controle da salmonelose. Já as vacinas vivas estimulam de forma mais efetiva a resposta imune celular, o que as torna mais eficazes para a imunização contra este tipo de patógeno (Papezova *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 1991).

Uma das primeiras vacinas utilizadas na profilaxia da febre tifóide humana, sendo um dos modelos para vacinas contra *Salmonella*, foi a linhagem Ty21, um mutante derivado de uma linhagem de *S. enterica* Typhi, vendida pelo nome de Vivotif pela Bernabiotech, Suíça. Esta vacina é excessivamente atenuada e possui baixa expressão do antígeno Vi, o que leva a necessidade de várias doses para garantir proteção. Mutações em *galE* e *rpoS* são apontadas como responsáveis pela atenuação, porém a dimensão de suas modificações genéticas não é conhecida (Guzman *et al.*, 2006). Apesar das desvantagens apresentadas por esta linhagem vacinal, ela foi um marco importante para o estabelecimento das vacinas atenuadas.

Contra a febre tifóide em aves, foi desenvolvida a vacina atenuada SG 9R, uma linhagem da sorovariedade Gallinarum que após sucessivas passagens e seleção em laboratório resultaram em um fenótipo com alterações em seu LPS. Alguns estudos indicam que esta variedade também garante proteção contra a sorovariedade Enteritidis (Avila, 2005), possivelmente devido a proximidade entre essa sorovariedade e a variedade Gallinarum. Apesar do sucesso desta vacina ela apresenta a desvantagem de persistir na ave e poder ser transmitida pelo ovo.

Na União Européia, as vacinas atenuadas mais utilizadas para a proteção das galinhas poedeiras são AviPro *Salmonella* vacT ou vacE e GallivacSE. Todas elas foram criadas por mutagênese aleatória e possuem sua atenuação baseada em auxotrofia e tempo de geração prolongado, porém a base genética específica que levou a este fenótipo não é conhecida. No caso da *Salmonella* vacT e vacE, genes de resistência a antibióticos são utilizados como marcadores, uma característica muito indesejável para uma vacina atenuada, levantando questões sobre sua segurança (Karasova *et al.*, 2009)

Linhagens vacinais em desenvolvimento frequentemente utilizam mutantes nos genes *aro*, como forma de atenuação (Cooper *et al.*, 1990; Hormaeche *et al.*, 1996; Villarreal-Ramos *et al.*, 1998). Outras mutações utilizadas para a obtenção de mutantes atenuados são nos genes *phoP*, *htrA* e *galE*.

Muito destes mutantes são sensíveis a componentes particulares do sistema imune, como  $\Delta$ *phoP* ou mutantes envolvidos na síntese do antígeno O, que possuem grande sensibilidade a peptídeos antimicrobianos (Groisman *et al.*, 1992; Groisman *et al.*, 1997), enquanto mutantes nos genes *aro* tornam a bactéria sensível ao sistema complemento (Karasova *et al.*, 2009).

Dessa forma, obter linhagens atenuadas que possam gerar uma resposta imune mais generalizada, incluindo imunidade mediada por células e mantendo níveis baixos de virulência e persistência, é um dos maiores desafios da obtenção de vacinas contra *Salmonella*.

Recentemente, foi descrita a construção de linhagens de *S. enterica* onde as mutações atenuadoras da virulência são condicionadas à presença de arabinose. Nesta estratégia, os mutantes apresentam o fenótipo selvagem de virulência quando crescidos *in vitro* na presença de arabinose, mas após poucos ciclos de multiplicação *in vivo*, devido à ausência de arabinose nos

tecidos hospedeiros, exibem atenuação (Curtiss *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009, Juárez-Rodríguez *et al.*, 2012). Estes últimos autores demonstraram que tais linhagens são efetivas na indução de resposta imunológica. Este sistema de atenuação é bastante promissor para o desenvolvimento de linhagens vacinais.

### **1.5. O Nucleóide Bacteriano**

Bactérias contêm Proteínas Associadas ao Nucleóide bacteriano juntamente com o DNA cromossômico e recebem o nome de NAP's. Diferente das histonas de eucariotos, as NAP's não nucleossomas (Thanbichler *et al.*, 2005) e também não possuem a mesma origem evolutiva com as histonas. Dentro deste grupo encontram-se 12 proteínas sendo que as melhor estudadas são HU, FIS, IHF, HNS e DPS (Dorman, 2009; Dorman e Kane, 2009; Cróinín e Dorman, 2007; Dorman *et al.*, 2006; Drlica e Rouviere-Yaniv, 1987).

A proteína IHF (*Integration host factor*) é um heterodímero composto pelas subunidades  $\alpha$  (IHF- $\alpha$ ) e  $\beta$  (IHF- $\beta$ ), que são codificados pelos genes *ihfA* e *ihfB*. A expressão de IHF é aumentada na fase estacionária de crescimento e vários genes estão sob seu controle positivo (Magan *et al.*, 2006; Ali *et al.*, 2001; Ishihama, 2000). IHF impõe ao DNA curvaturas de aproximadamente 180° (Lorenz *et al.*, 1999), sendo essa atividade capaz de induzir importantes alterações topológicas no DNA (Dorman, 2009; Thanbichler *et al.*, 2005), modulando a expressão de vários genes, assim como outros eventos celulares (Dorman, 2009; Goosen e van de Putte, 1995). O uso da técnica ChIP-seq permitiu a identificação das regiões de ligação de IHF na sua forma de heterodímero e homodímeros, mostrando que cada forma se liga pode se ligar em regiões diferentes do cromossomo bacteriano e possivelmente regulando a expressão gênica de forma diferencial (Prieto *et al.* 2012).

FIS (*Factor for Inversion*) é a proteína *histone-like* de *E. coli* mais abundante na fase exponencial de crescimento, mas sua concentração diminui drasticamente na fase estacionária (Dorman, 2009; Cróinín e Dorman, 2007; Ali-Azam *et al.*, 1999). Esta variação de concentração sugere uma função importante de FIS na transição da fase exponencial para a fase estacionária de crescimento. De fato, uma função biológica relevante de FIS é a ativação da expressão de genes envolvidos na maquinaria de tradução, tais como operons de RNA e de fatores de tradução (Thanbichler *et al.*, 2005). Dados de *microarray* indicaram papel importante de FIS na expressão de genes associados à patogenicidade, assim como genes de manutenção (Kelly *et al.*, 2004). A ligação ao DNA é dependente da presença de uma sequência degenerada formada por 15 nucleotídeos (Wagner, 2000).

Nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de preparações vacinais que utilizam mutantes para genes *histona-likes* em *S. enterica* (Oliveira *et al.*, 2007; Covone *et al.*, 1998; Brocchi *et al.*, 1999). Recentemente, mutantes nulos de *S. enterica* Typhimurium para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína IHF (sigla em inglês para “Fator de Integração do Hospedeiro”) construídas por nosso grupo foram atenuados quanto à virulência (Martines *et al.*, manuscrito em preparo) e se configuraram em potenciais candidatos a linhagens vivas vacinais.

## **1.6. Patogenicidade**

As sorovariiedades de *S. enterica* são patógenos intracelulares facultativos, pois apresentam a capacidade de invadir e sobreviver em células da mucosa intestinal e macrófagos (Jones *et al.*, 1994). Parte do arsenal de *S. enterica* se encontra em uma série de tipos diferentes de fímbrias ou adesinas, que variam de acordo com as sorovariiedades. Essas fímbrias estão envolvidas com a adesão inicial a células ou à matriz extracelular, iniciando a colonização do trato intestinal e participando no processo de invasão tecidual (van Asten e van Dijk, 2005;

Figueroa-Ochoa e Verdugo-Rodrigues, 2005). A fímbria Lpf (*long polar fimbriae*), por exemplo, está envolvida com a adesão nas placas de Payer (Baumler *et al.*, 1996). O sequenciamento do genoma da linhagem de *S. enterica* Typhimurium LT2 evidenciou a presença de 13 *operons* fimbrianos (McClelland *et al.*, 2001). Recentemente, Weening *et al.* (2005) demonstraram que seis destes operons contribuem com a colonização da mucosa intestinal no modelo murino. Algumas fímbrias também estão envolvidas na formação de biofilme (Ledebouer *et al.*, 2006). Muitos dos operons fimbriais não foram relacionados à virulência e possuem papel na patogênese desconhecido, possivelmente porque o modelo murino não oferece uma situação de gastroenterite com diarreia, uma situação em que a adesão fimbrial seria necessária. Além disso, sorovarietades que infectam mais de um hospedeiro podem possuir fímbrias específicas para a colonização de cada espécie, possuindo seu receptor em apenas um grupo de hospedeiro.

Uma característica fundamental de *S. enterica* é causar uma intensa inflamação na mucosa intestinal. Este processo é induzido em grande parte pela flagelina, a proteína que compõe o corpo flagelar, e Sistemas de Secreção Tipo 3 (TSS-3). *S. enterica* secreta ativamente monômeros de flagelina que alcançam a porção basolateral das células e desencadeiam o processo inflamatório via reconhecimento por *Toll-like receptor 5* (TLR 5) (Zeng *et al.*, 2006; 2003; Gewirtz *et al.*, 2001). A flagelina também é reconhecida intracelularmente por receptores do tipo Toll, em um processo que resulta na ativação de caspase 1 e a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos infectados (Franchi *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2006).

A maioria dos genes de virulência de *S. enterica* está localizada em Ilhas de Patogenicidade que são denominadas SPI para “*Salmonella pathogenicity island*” (Lavigne e Blanc-Potard, 2008; van Asten e van Dijk, 2005). Dez SPI foram descritas em *S. enterica*, outras regiões do genoma que apresentam certas características de SPI estão sendo estudadas

(Mastroeni e Maskell, 2006). A SPI-1 foi a primeira a ser descrita (Mills *et al.*, 1995; Galan e Curtiss, 1989) e codifica um sistema secreção do tipo III que injeta efetores na célula alvo, levando a uma reestruturação no seu citoesqueleto facilitando a invasão e induzindo respostas inflamatórias (McGhie *et al.*, 2009; Coburn *et al.*, 2007).

A inflamação no lúmen intestinal causada pela *S. enterica* gera espécies reativas de oxigênio que reagem com o tiosulfato resultando em tetrionato, este último pode ser utilizado por *S. enterica* como acceptor de elétrons, permitindo que esta bactéria respire em um ambiente onde predomina a fermentação, o que lhe garante uma vantagem competitiva contra a microbiota (Winter *et al.* 2010). A capacidade de utilizar tetrionato como acceptor de elétrons também está associada ao uso de etanolamina, uma fonte de carbono liberada pelo hospedeiro, mas inacessível à microbiota que apenas fermenta. (Thienemithir *et al.* 2011).

Uma vez ultrapassada a mucosa intestinal, *S. enterica* invade, persiste e prolifera no interior de vacúolos de células do sistema retículo endotelial podendo assim, alcançar diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro, causando infecção sistêmica (Mastroeni e Maskell, 2006; Salyers e Whitt, 2002; Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). SPI-2 e SPI-3 e o sistema regulatório de dois componentes PhoP/Q estão envolvidos com a sobrevivência e multiplicação intracelular. Em tempos mais recentes, a capacidade de *S. enterica* de invadir e sobreviver em células dendríticas vem sendo estudada com maior detalhe (McGhie *et al.*, 2009; Biedska-Sarek e Skurnik, 2006; Groisman, 2001; Vazquez-Torres *et al.*, 2000; Blanc-Potard *et al.*, 1999)).

A regulação dos fatores de patogenicidade em *S. enterica* é complexa e envolve tanto processos de regulação transcricional como pós-transcricional (Cotter e DiRita, 2000). Dentro deste último grupo está a proteína Hfq, uma chaperona de RNA que regula a expressão pós-



transcricional de vários genes em *S. enterica*, sendo uma proteína essencial para a virulência (Sittka *et al.*, 2007). A deleção desse gene resulta em uma linhagem atenuada que tem sido explorada para uso vacinal (Allam *et al.* 2011)

Devido ao seu modo de infecção, é essencial para a *S. enterica* resistir ao pH ácido do estomago. Este processo é mediado por alterações fisiológicas como a expressão de proteínas relacionadas ao estresse, proteínas de superfície e sistemas de secreção ativos (Rychlik e Barrow, 2005).

Uma das vantagens da utilização destes genes para a construção de mutantes nas linhagens vacinais é que eles afetam vários diferentes aspectos do fenótipo da bactéria que pode reduzir sua virulência (Mangan *et al.* 2006), não se limitando a apenas uma característica, como mutantes nos genes *aro*, *phoP* ou para síntese do antígeno O que tem sido mais explorados (Shaio e Rowland, 1985; Groisman *et al.*, 1992; Groisman *et al.*, 1997) .

## 2. Objetivos

O objetivo principal desse projeto foi a construção de linhagens recombinantes de *S. enterica* Enteritidis, mutante nulos para os genes *ihfA*, *ihfB* e *fis*, com o intuito de caracterizar sua virulência e caso sejam atenuadas, seu potencial imunogênico protetor.

Dentro deste objetivo principal, as metas foram:

- Construção das linhagens
- Teste de atenuação
- Avaliação da proteção

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Primers, plasmídios e linhagens bacterianas.

Todos os plasmídios utilizados estão na Tabela 1, com suas informações técnicas sumarizadas. As linhagens de *E. coli* e *S. Enterica* utilizadas e sua descrição estão na Tabela 2. Os primers utilizados estão representados na Tabela 3 e foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (USA).

**Tabela 1:** Plasmídios utilizados neste trabalho

PLASMÍDIOS	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
pKD46	Amp <sup>r</sup> , contém genes constituintes do sistema de recombinação $\lambda$ Red.	Datsenko e Wanner (2000)
pKD3	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , plasmídio molde para construção do cassete de recombinação.	Datsenko e Wanner (2000)
pCP20	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , plasmídio que codifica a recombinase FLP.	Datsenko e Wanner (2000)
pBAD	Amp <sup>r</sup> , araC, contém o promotor pBAD	Invitrogen
pERA1	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , pKD3 com remoção do sítio NcoI do gene <i>cat</i>	Este estudo
pERA2	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Clonagem de <i>araC</i> e pBAD em pKD3	Este Estudo

**Tabela 2:** Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho

Linhagens	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
<i>E. coli</i>		
DH10 $\beta$	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <math>\lambda</math>- <i>rpsL nupG</i></i>	Invitrogen
<i>S. enterica</i>		
SE 602	<i>S. enterica</i> Enteritidis Selvagem	Coleção Laboratório
SE 672	<i>S. enterica</i> Enteritidis Selvagem	Coleção Laboratório
SE PT4	<i>S. enterica</i> Enteritidis PT4 Selvagem	Coleção Biovet
ST 662	<i>S. enterica</i> Typhimurium Selvagem	Coleção Laboratório

**Tabela 3:** Primers utilizados neste trabalho

<i>Primer</i>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>
ihfA-R	GCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTG ATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Mendes N.P.
ihfA-F	CGCAATACACCCTGATGGATGTTATGCCTGGATCTGA TTACATATGAATATCCTCCTTAGTTC	Mendes N.P.
ihfB-F	CAGCCAATTTGCCTTTAAGGAACCGGAGGAATCATGA CCAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Mendes N.P.
ihfB-R	TTTTTCGGGTTCAAGTTTTGCGTTAAAACTTAACCGTA AATCATATGAATATCCTCCTTAGTTC	Mendes N.P.
fis-F	GCGTAAACAGAAATAAAGAGCTGACAGAACTATGTTC GAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Pereira N.P.
fis-R	TTTTAAACAAGCAGTTAGCTAATCGAAATTAGTTCAT GCCCATATGAATATCCTCCTTAGTTC	Pereira N.P.
ihfADT-R	TTGCGGAGGGTTATAAGAGC	Mendes N.P.
ihfADT-F	GCGTGATTTTACGGTGGGTA	Mendes N.P.
ihfBDT-F	GTTTCGGCCTGTAATCAAGC	Mendes N.P.
ihfBDT-R	TTTTCGGTCTGAATAGCGTTT	Mendes N.P.
fisDT-F	TTTTCGGTCTGAATAGCGTTT	Oliveira N.P.
fisDT-R	TTTTCGGTCTGAATAGCGTTT	Oliveira N.P.
ara-F	ATGGCAATTGCAATTGGCCTCGATTTTGGCAGTGATTC AGTGCGCGCTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Este estudo
ara-R	TTACTGCCCGTAATAGGCTTTTGGCGCGTGTTTGGCGTA GATAGTGTTTATCATATGAATATCCTCCTTAG	Este estudo
pera1-F	GTGAAAACGGGGGCGAAGAAG	Este estudo
pera1-R	GATGGCAAATATTATACGCAAGG	Este estudo

### 3.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram LB ou LB-Ágar (Sambrook e Russell, 2001), ágar MacConKey (Difco) e Salmonella-Shiguella Agar (Difco). Os antibióticos cloranfenicol e ampicilina, quando requeridos, foram utilizados nas concentrações de 25µg/ml e 100µg/ml respectivamente, conforme Sambrook e Russell (2001).

### **3.3. Métodos moleculares**

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A Taq DNA polimerase utilizada foi LGC Easy Taq DNA polimerase e foram utilizadas as especificações fornecidas pelo fabricante.

Para a extração e purificação dos plasmídios pKD3 e pKD46 foi utilizado o kit GE Healthcare Illustra Mini Spin Kit seguindo as instruções do fabricante. Para o plasmídio pCP20 foi utilizado o kit Qiagen Plasmid Midi Kit seguindo as instruções do fabricante. A extração do plasmídio de virulência foi feita segundo Takahashi e Nagano (1984).

Os produtos de PCR e extrações plasmidiais foram visualizados em gel de agarose 1%. Após a corrida, o DNA no gel foi corado em solução de Gel-Red™ seguindo instruções do fabricante (Biotium – Hayward, USA) e o DNA visualizado em transiluminador de UV, sendo os resultados registrados com o fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging – New Haven, USA)

A introdução dos plasmídios nas células bacterianas foi feita por eletroporação. Células eletrocompetentes e eletroporação foram feitos como descrito anteriormente (Sambrook e Russell, 2001; Ausubel et al., 2003). O eletroporador utilizado Gene Pulser X-Cell (Hercules - CA, USA) configurado para 1800V, 25microF e 200Ω.

### **3.4. Construção das linhagens recombinantes**

#### **3.4.1. Linhagens bacterianas selecionadas para mutagênese**

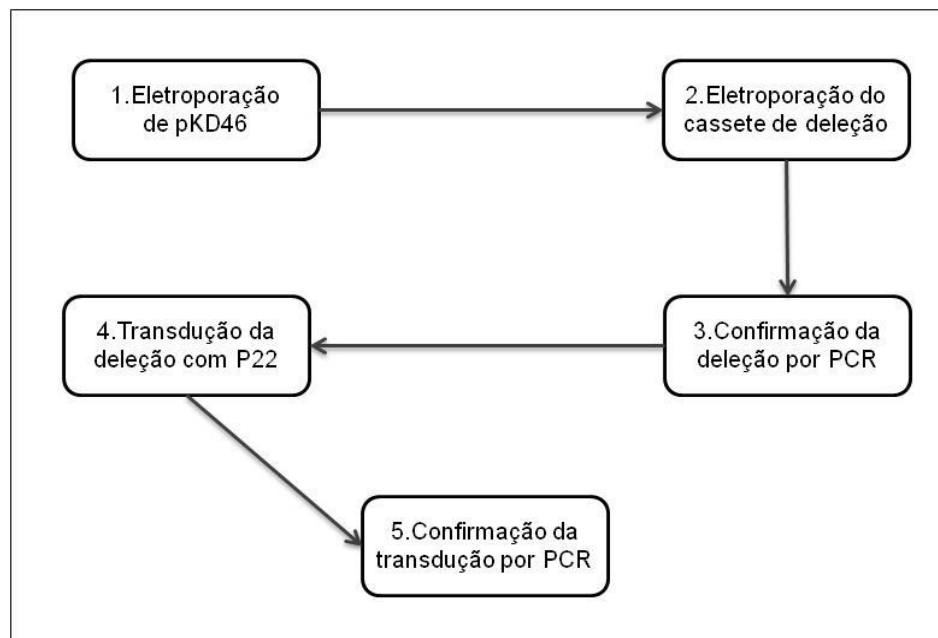
Neste estudo foram utilizadas três linhagens selvagens de *S. enterica*, uma sorovar Typhimurium (ST662) e outras duas Enteritidis (SE602 e SE672) que fazem parte da coleção do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular (Instituto de Biologia - UNICAMP), isoladas de

pacientes com quadro clínico de salmonelose que deram entrada no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (Sales, 2007). Também foi utilizada uma linhagem do serovar Enteritidis do fagotipo 4 (SE PT4) que foi cedida pela empresa veterinária Biovet.

As amostras selecionadas foram estocadas em glicerol 2,5 M, segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001).

### 3.4.2. Mutagênese

A mutagênese dos genes *fis*, *ihfA* e *ihfB* foi obtida pelo sistema  $\lambda$  Red conforme descrito por Datsenko e Wanner (2000). Este sistema é constituído pelos plasmídios pKD3, pKD46 e pCP20 (Tabela 2). A transdução mediado pelo fago P22 foi utilizada para remover possíveis mutações secundárias indesejadas. A Figura 1 esquematiza os passos da construção das linhagens.



**Figura 1.** Esquema representando as etapas e sua ordem na construção das linhagens recombinantes de *S. enterica*.

### **3.4.3. Primers utilizados para gerar os cassetes de recombinação**

Os *primers* para este método são compostos de 2 partes contínuas, sendo a primeira uma sequência de aproximadamente 40 bases homólogas ao gene alvo e a segunda 20 bases homólogas a uma região presente no plasmídeo pKD3 (Datsenko e Wanner, 2001). As sequências estão apresentadas na tabela 3.

### **3.4.4. Construção do cassete de recombinação por PCR**

Os cassetes de recombinação foram construídos utilizando iniciadores descritos na Tabela 2, utilizando o plasmídeo pKD3 como molde. O volume das reações 20 µl contendo 20 pmol de cada iniciador, 20 a 30 ng de DNA plasmidial, 1mM de cada dNTP, 2U de Taq DNA polimerase e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> em tampão apropriado provido pelo fabricante da enzima.

O programa do PCR foi feito da seguinte forma: Uma denaturação inicial do DNA a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos compostos por: 1 - denaturação a 94°C por 30 segundos; 2- *annealing* a 56°C por 30 segundos; 3 - extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Procedeu-se uma extensão final por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook e Russell, 2001).

### **3.4.5. Transformação das linhagens de *S. enterica* com o plasmídeo pKD46**

A transformação das linhagens com o plasmídeo pKD46 foi realizada por eletroporação. As colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas e foram estocadas em glicerol 2,5M segundo protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001).

### **3.4.6. Troca alélica dos genes *ihfA* e *ihfB* pelo cassete de recombinação**

O preparo das células competentes foi feito utilizando as linhagens contendo pKD46 e antes do preparo das células competentes foi feita a ativação do sistema λ Red. Um inóculo para cada linhagem em meio LB Amp de 3ml, foi incubados durante à noite a 30°C sob agitação

(150 rpm). Desta cultura, foram retirados 0,5 ml que foi inoculado em 50 ml de meio LB com o mesmo antibiótico, na mesma concentração e 1mM de L-arabinose (Sigma), usado como indutor da expressão dos genes  $\gamma$ ,  $\beta$ , e *exo*, sendo esta nova cultura crescida a 30°C sob agitação (150 rpm) até atingir D.O.600 de 0,6. Com esta cultura foram feitas as células competentes como descrito anteriormente.

Foram selecionados 3 tubos contendo as alíquotas aos quais foram adicionados 20-100ng do produto gerado pela PCR; estes foram colocados em banho de gelo por 1 minuto e então eletroporado. As células foram recolhidas em meio LB e incubadas a 37°C por 1h, posteriormente foram plaqueadas em meio LB Cm. As placas foram incubadas por 16h a 37°C. Das colônias crescidas, Foram selecionadas duas de cada linhagem para confirmação da deleção.

#### **3.4.7. Confirmação das mutações em *ihfA*, *ihfB* e *fis* por PCR**

Para confirmar as mutações, utilizamos reações de PCR com os *primers* ihfADT-RF/R, ihfBDT-F/R e fisDT – F/R.

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

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



### **3.4.8. Transdução com bacteriófago P22**

As linhagens SE602 *ihfA:cat*, SE602 *ihfB:cat*, SE 602 *fis:cat*, SE PT4 *ihfA:cat*, SE PT4 *ihfB:cat* e SE PT4 SE PT4 *fis:cat* foram incubadas em 3 ml de meio LB Cm por 8 horas a 37° C, quando 1 ml de solução contendo o bacteriófago P22 ( $5 \times 10^6$  pfu/ml) foi adicionado. O inóculo com P22 foi incubado 16h a 37°C e agitação de 150 rpm.

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

Em paralelo as linhagens selvagens receptoras foram crescidas em meio LB até que atingissem D.O.600 igual a 0,6 e então em 100 µl dessa cultura foram adicionados 10 µl de suspensão de P22 obtida anteriormente. As culturas foram, então, incubadas por 20 minutos a 37° C, para a adsorção do bacteriófago e plaqueadas em LB Cm e incubadas 16h a 37°C durante à noite.

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

Para a eliminação do gene de resistência ao antimicrobiano, foram utilizadas células competentes preparadas das linhagens SE602 *ihfA:cat*, SE602 *ihfB:cat*, SE602 *fis:cat*, SEPT4 *ihfA:cat*, SEPT4 *ihfB:cat*, SEPT4 *fis:cat*. O plasmídio pCP20 foi inserido nas células bacterianas por eletroporação. Das colônias positivas para a transformação foram selecionadas duas de cada linhagem para confirmação da remoção da marca de resistência por PCR e perda da resistência à cloranfenicol. Estas linhagens foram estocadas em glicerol 2,5M como descrito anteriormente (Sambrook e Russell, 2001).

### **3.5. Curva de crescimento *in vitro***

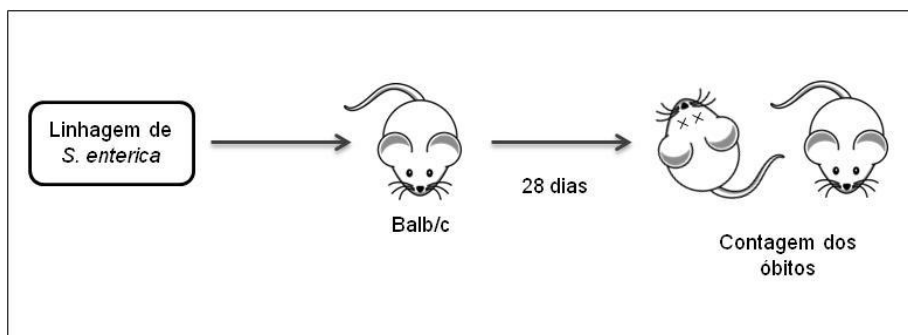
As linhagens SE PT4 *ihfA:cat*, SE PT4 *ihfB:cat* e SE PT4 SE PT4 *fis:cat* foram inoculadas em 3ml de meio LB e incubadas à 37° C 16h. No dia seguinte, 1 ml do inóculo foi adicionado a 100 ml de meio LB e a nova cultura incubada a 37°C sob agitação (150 rpm), sendo retiradas alíquotas a cada hora, durante oito horas. De cada alíquota foi medida a densidade óptica em comprimento de onda 600nm (D.O.600).

### **3.6. Experimentos *in vivo***

#### **3.6.1. Determinação da Dose Letal (DL50) por via oral em camundongos**

Para determinação da DL50 por via oral, as linhagens SE602 *ihfA:cat*, SE602 *ihfB:cat*, SE 602 *fis:cat*, SE PT4 *ihfA:cat*, SE PT4 *ihfB:cat* e SE PT4 SE PT4 *fis:cat* foram inoculadas em 3ml de meio LB e incubadas à 37° C 16h. Deste inóculo, 1 ml foi adicionado a 100 ml de meio LB e a nova cultura incubada a 37°C sob agitação (150 rpm) até que atingissem D.O.600 igual a 0,6. A cultura foi centrifugada a 5000rpm por 10 minutos e ressuspensa em PBS gélido. O inóculo foi feito via oral utilizando agulha de gavagem modelo IC800 (INSIGHT, Ribeirão Preto-SP, Brasil).

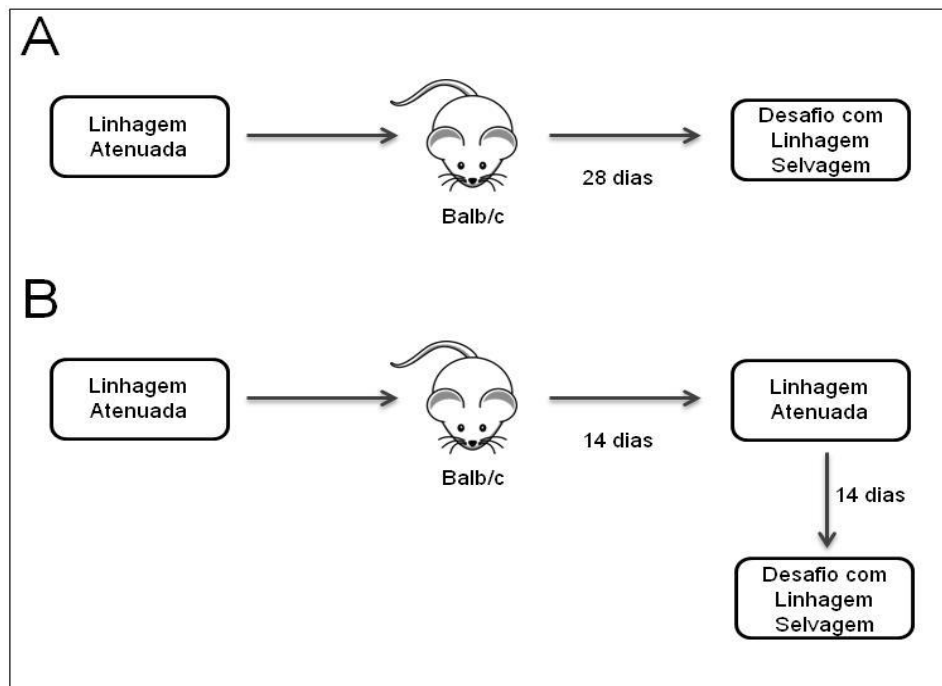
A quantidade de bactérias inoculadas variou de acordo com cada grupo, sendo variáveis, em escala logarítmica de base 10, de  $10^9$  a  $10^2$  UFC/ml, sendo utilizados cinco camundongos por diluição. Os animais foram acompanhados por 28 dias após o inóculo. O cálculo da DL50 foi feito com o emprego do programa MAI que utiliza o método de “*Moving Average Interpolation*” (Welkos e O’Brien, 1994). O experimento está esquematizado na Figura 2.



**Figura 2:** Esquema do experimento para determinação da DL50.

### 3.6.2. Desafio via oral

A capacidade de desencadear resposta imune protetora contra *S. enterica* foi testada com uma e duas imunizações. Em ambos os experimentos grupos de 5 camundongos BALB/c fêmeas animais foram inoculados com uma linhagem atenuada como descrito anteriormente, o grupo com duas imunizações foi inoculado novamente após 14 dias. O desafio foi feito 28 dias após a última inoculação. As doses de imunização foram de  $10^6$  e  $10^7$  UFC das linhagens SE PT4 *ihfA:cat* e SE PT4 *ihfB:cat*, um grupo controle utilizado foi inoculado com PBS. Os animais foram desafiados com doses de  $10^5$  UFC da Linhagem SE PT4. Após o desafio, os animais foram acompanhados por 28 dias avaliando sua sobrevivência. Na Figura 3, estão esquematizados os dois tratamentos feitos neste experimento.

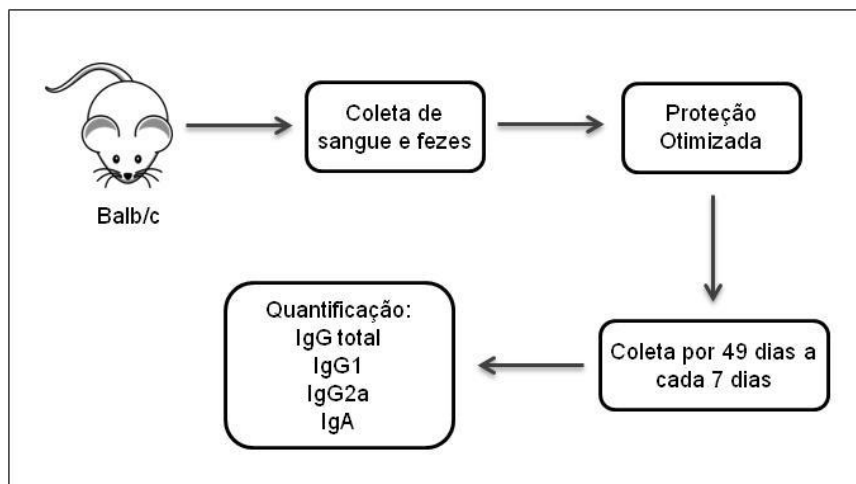


**Figura 3:** Esquema representando os dois tratamentos de proteção. A; uma dose da linhagem atenuada, B; duas doses das linhagens atenuadas.

### 3.7. Quantificação de anticorpos.

#### 3.7.1. Coleta e processamento de sangue

A coleta de sangue foi feita antes da primeira imunização para a obtenção de soro pré-imune e após a última imunização em intervalos de 7 dias, durante 7 semanas. Foi utilizada a imunização otimizada, que é o tratamento com melhor resposta para cada linhagem. Em cada ponto de coleta foram coletados o soro de 7 animais para cada grupo experimental, os grupos foram inoculados com as linhagens PT4 *ihfA:cat* e SE PT4 *ihfB:cat* e um controle inoculado com PBS. A coleta foi feita por punção retro-orbital obtendo-se aproximadamente 0,5ml de sangue por animal. Os tratamentos e coletas estão representados na Figura 4. A separação do soro foi feita pela centrifugação do sangue por 30 minutos a 14000 rpm e o armazenamento foi feito a -20°C.



**Figura 4.** Esquema dos tratamentos e coletas para quantificação de anticorpos.

### 3.7.2. Detecção de anticorpos séricos

O ensaio de ELISA foi realizado para a detecção de anticorpos séricos IgG total, IgG1 e IgG2a antígenos específicos.

Para tanto, foram usadas placas de poliestireno (NUNC, Inc. Naperville USA) incubadas com antígenos totais de SE PT4, na concentração final de 1 $\mu$ g. A diluição foi feita em tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,6 (100 $\mu$ l/poço). Após 24 horas de incubação a 4°C, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T/Sigma) e incubadas com 200 $\mu$ l/poço de solução de bloqueio (PBS-T contendo gelatina 3%) por 1 hora a 37°C. A seguir as placas foram lavadas e incubadas 100 $\mu$ l das amostras dos soros na diluição de 1:30 na solução de bloqueio (PBS-T gelatina 1%), por 2 horas a 37°C. Após 5 lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com anticorpos de cabra anti-IgG total, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo, conjugados à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), diluídos 1:5000 em PBS-T gelatina 1%. Após 1 hora de incubação a 37°C, os poços foram novamente lavados, sendo a reação antígeno-anticorpo revelada pela adição de 100  $\mu$ l/poço de tetrametilbenzidina (TMB/Pierce), na

concentração sugerida pelo fabricante. A reação foi bloqueada pela adição de 50µl de ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada a 450nm em leitor de microplacas (Power Wavv X – Bio Tek Instruments, INC)

### **3.7.3. Coleta e processamento de material fecal para a detecção de IgA de mucosa**

A coleta de fezes foi nos mesmo pontos da coleta de sangue e nos mesmo grupos de animais previamente descritos. Imediatamente após a amostragem, o material fecal foi transferido isoladamente para tubos de microcentrífuga contendo PBS, 1mM PMSF (Sigma) e 1% BSA (Sigma). Este material foi incubado 16h a 4°C. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C.

### **3.7.4. Detecção de IgA**

A detecção de IgA foi feita da mesma forma descrita para anticorpos séricos. A única diferença está na detecção. Nesta etapa foi utilizado anticorpos biotinilados de coelho anti-IgA de camundongo (Sigma), diluído 1:500 em PBS-T gelatina 1% que foram detectados utilizando-se neutravidina-peroxidase.

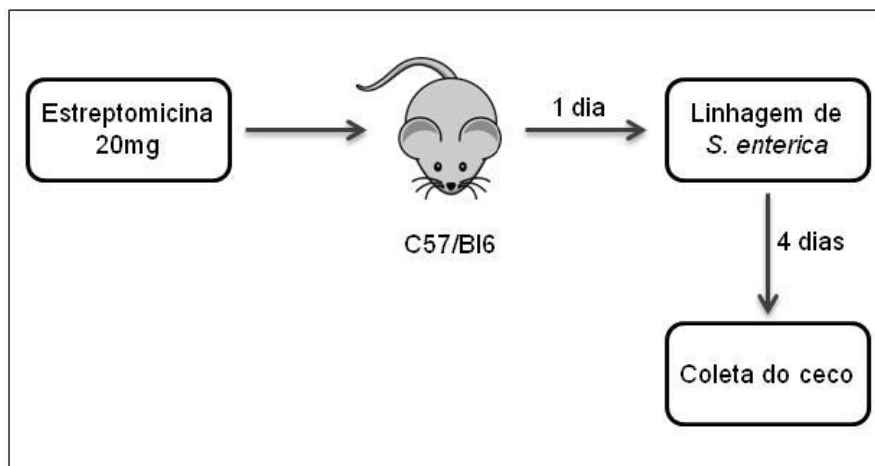
### **3.7.5. Obtenção do extrato antigênico de SE PT4**

A linhagem SE PT4 foi cultivada em 10ml de meio LB a 37°C, 200 rpm 16h. Posteriormente, as culturas foram sedimentadas por centrifugação (10000 rpm por 15 minutos a 4°C) e lavadas 2 vezes com PBS. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 5ml de PBS contendo 1mM de PMSF (Sigma) e as suspensões bacterianas foram sonicadas por 5 ciclos de 30 segundos (Vibra-cell – Sonics & Material Inc., Danbury, USA). O material sonicado foi centrifugado a 14400 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante estocado a -20°C.

### 3.8. Modelo de inflamação

#### 3.8.1. Indução de inflamação

A inflamação do ceco foi induzida segundo o protocolo de Barthel et. al 2003. Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com de 6 a 8 semanas. Os animais foram tratados com 20mg de estreptomicina diluída em PBS por via oral como descrito anteriormente. 24h após este tratamento, os animais foram distribuídos em grupos com 5 indivíduos e cada grupo foi inoculado com  $10^8$ UFC de uma das linhagens: SE PT4, SE PT4 *fis:cat*, ST662 e ST662 *fis:cat*. Um grupo controle foi inoculado com PBS. Os tratamentos estão representados na Figura 5.



**Figura 5:** Esquema representando o modelo experimental para indução da inflamação no ceco.

#### 3.8.2. Coleta e fixação

A coleta do ceco foi feita 4 dias após o inoculo. Os órgãos foram removidos e imediatamente embebidos em uma solução fixadora (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,5%) onde permaneceram por 24 horas. Após esse período as extremidades do órgão foram cortados

para permitir a lavagem do lúmen, removendo o material fecal, para a lavagem foi utilizada a solução fixadora. O material fixado foi mantido em solução etanol 70% 4°C.

### **3.8.3. Processamento e coloração**

As amostras foram cortadas para caberem no molde dos blocos de historesina e depois passaram por uma bateria de desidratação. A solução de etanol em que as amostras estava foi trocada em um gradiente crescente de etanol, passando pelas concentrações de 70%, 80%, 95% e três vezes em 100%. O tempo em cada solução foi de 30 minutos. Após a última etapa da desidratação, as amostras foram transferidas em uma solução de historesina (Leica Embedding Kit) e etanol 1:1, onde permaneceu por 3 horas até ser transferida para a historesina 100%. A solidificação da resina foi feita com o uso do ativador (Leica Embedding kit) seguindo as instruções do fabricante.

Com as amostras emblocadas, elas foram cortadas no micrótono Leica RM2145 em cortes de 3µM. Foram coletados 6 cortes de cada amostra, com um espaçamento de 10µM entre elas. Para a coloração foi utilizado corante de Rosenfeld.



## 4. Resultados

### 4.1. Deleção dos genes *ihfA*, *ihfB* e *fis*

#### 4.1.1. Extração dos plasmídios

A extração dos plasmídios pKD3, pKD46 e pCP20 foi feita como o descrito anteriormente. O sucesso da extração foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1% confirmando o perfil plasmidial [pKD3 (2,9kpb), pKD46 (6,0kpb) e pCP20 (9,8Kpb)], dados não mostrados.

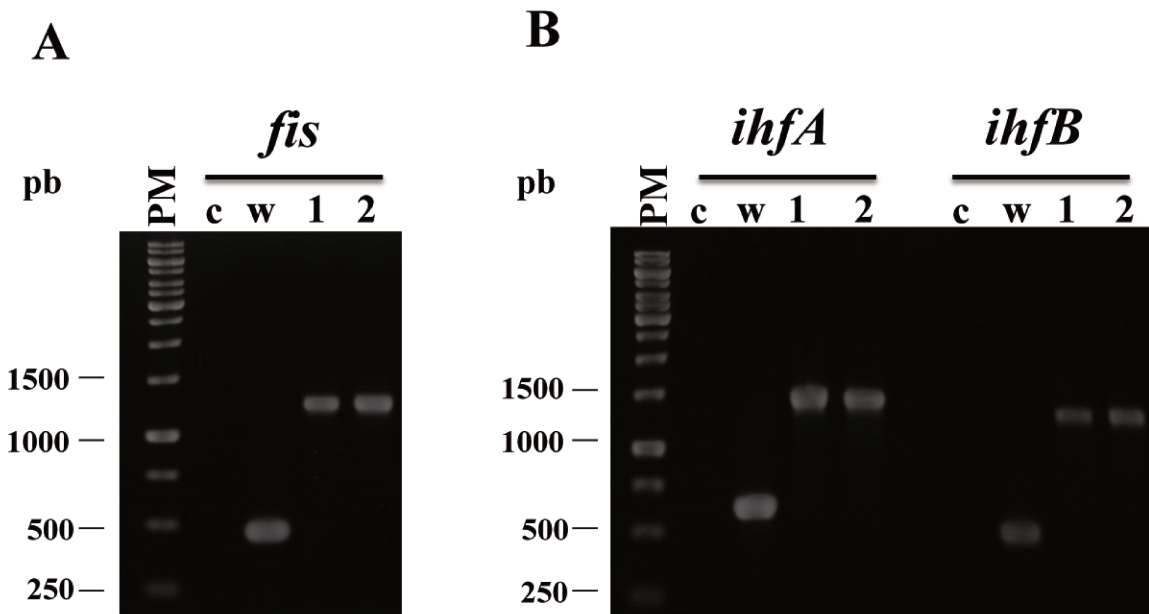
#### 4.1.2. Amplificação do cassete de deleção

Para realizar a amplificação por PCR do cassete de deleção foram utilizadas as duplas de *primers* *ihfA*-F/R, *ihfB*-F/R e *fis*-F/R. Este PCR utiliza como molde o plasmídio pKD3 e todos os seus produtos possuem o mesmo tamanho, ~1,2Kpb, divergindo apenas na região de homologia adicionada.

#### 4.1.3. Construção dos mutantes

O plasmídio pKD46 foi eletroporado nas linhagens de SE utilizadas, a seleção foi feita crescendo 16h as culturas em placas de meio LB Amp a 30°C. As colônias obtidas foram transferidas para outra placa de LB Amp para confirmar a presença do plasmídeo. As linhagens com pKD46 passaram pelo processo de ativação do sistema  $\lambda$  Red e então foram eletroporadas com os cassetes de deleção variando a quantidade de DNA utilizado entre 25-100ng. Essas culturas foram plaqueadas em meio LB Cm e crescidas 16h a 37 °C. As colônias obtidas foram transferidas novamente para placas de meio LB Cm e crescidas 16h a 37 °C, para confirmar a seleção.

A resistência a cloranfenicol é o marcador positivo, sugerindo que o cassete foi inserido no cromossomo, removendo o gene alvo e gerando a deleção. Para confirmar a inserção, um PCR foi feito utilizando as duplas de *primers* *ihfA*-DT R/F, *ihfB*-DT R/F e *fis*-DT R/F. Estes *primers* flanqueiam regiões próximas a ao começo e fim da CDS dos genes alvos, quando uma cultura que não sofreu deleção é amplificada com estes *primers* o resultado é um fragmento de ~500pb para *fis*-DT R/F e ~750pb para *ihfA*-DT R/F e *ihfB*-DT R/F. Quando a deleção foi bem sucedida este PCR tem como produto um fragmento com tamanho muito próximo ao cassete de deleção, 1,4Kpb. Comparando a amplificação de uma linhagem que não passou pela deleção com as colônias obtidas nesse processo, é possível confirmar a deleção.



**Figura 6. Deleção dos genes *fis*, *ihfA* e *ihfB*.** Os dados são referentes a linhagem selvagem PT4 de *S. enterica* Enteritidis e mutantes  $\Delta ihfA$ ,  $\Delta ihfB$ ,  $\Delta fis$ . C: controle da reação, sem adição de DNA; w: PT4; 1 e 2: PT4 $\Delta fis$  (painel A), PT4 $\Delta ihfA$  e PT4 $\Delta ihfB$  (painel B).

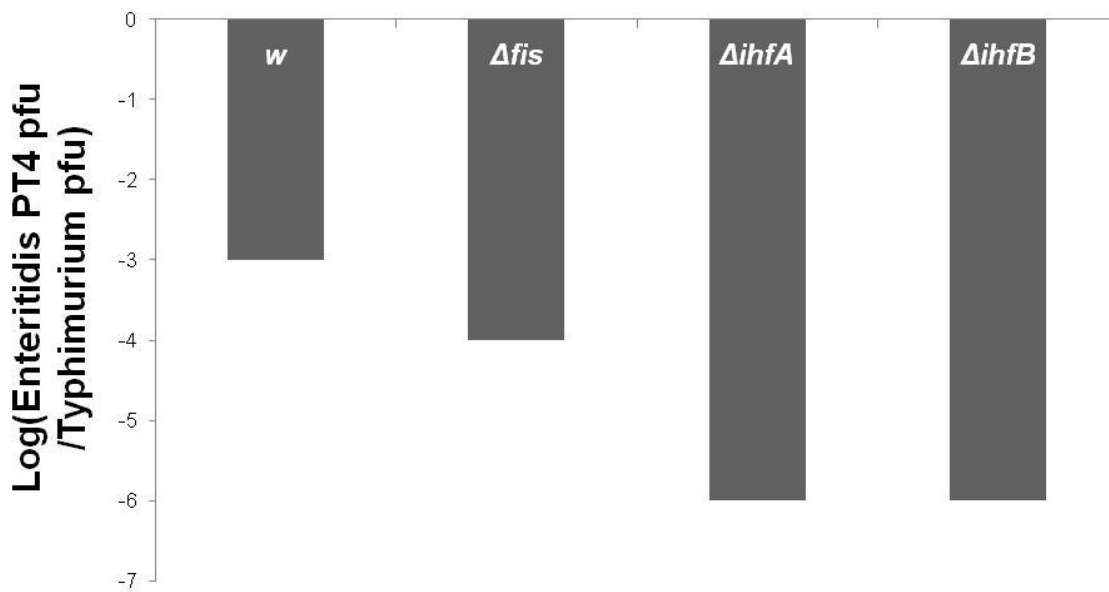
Pelo PCR com os *primers* ihfA-DT R/F, ihfB-DT R/F e fis-DT R/F pudemos confirmar a deleção para todas as linhagens utilizadas neste trabalho (Figura 6). O tamanho dos fragmentos obtidos é semelhante para todas as linhagens. Na Figura 1, as linhagens obtidas com a linhagem PT4 foram utilizadas para ilustrar os demais.

#### 4.1.4. Transdução

Após a deleção dos genes através do Sistema  $\Lambda$  Red, foi feita a mobilização das mutações por transdução para garantir a ausência de mutações secundárias devido às técnicas de manipulação genética, como a seleção de clones com LPS incompletos. A eficiência de transdução foi baixa, sendo necessária sua repetição para obtenção de mutantes. Para o gene  $\Delta ihfA$  não foi possível obter mutantes através desta técnica.

Para compreender os problemas nesta etapa do projeto, utilizamos uma mesma preparação de P22 e comparamos sua eficiência de infecção entre uma linhagem de Typhimurium utilizada para propagar o fago e os mutantes de Enteritidis (Figura 7).

Pela comparação dos títulos de P22 entre ST e SE pudemos estimar que SE PT4 selvagem apresenta uma eficiência menor de transdução na ordem de  $10^{-3}$  quando comparada a ST selvagem. O mutante  $\Delta fis$  apresenta uma redução na ordem de  $10^{-4}$  e os mutantes para IHF apresentam a menor redução, na ordem de  $10^{-6}$ . SE possui diferenças na constituição de seu LPS que é usado para a ancoragem do P22, provavelmente essa é a razão para as diferenças encontradas entre as duas sorovariiedades e no caso dos mutantes  $\Delta ihfA$  e  $\Delta ihfB$  essa redução na eficiência é amplificada pelas diferenças que o ciclo do P22 sofre ao infectar tais linhagens, que apesar de manter a capacidade de recombinar seu DNA com o DNA bacteriano, sofre repressão do seu ciclo lítico que leva a formação de menos partículas virais por célula (Cho *et al.* 1999).



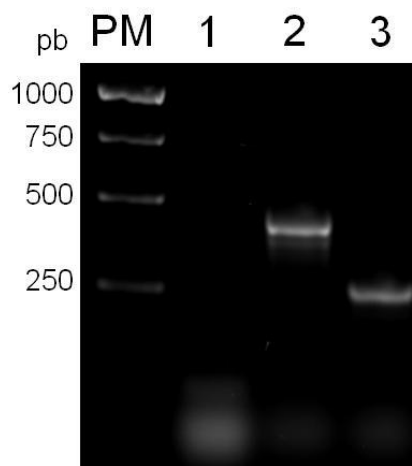
**Figura 7: Título do fago P22 obtido para diferentes mutantes de *S. enterica* Enteritidis comparado a *S. enterica* Typhimurium, *w* representa a linhagem selvagem e  $\Delta$  os mutantes para cada gene. Relação representada em escala logarítmica da titulação do mesmo preparado de P22 feito para as linhagens selvagem e mutantes de SE Enteritidis, dividido pelo título obtido com o mesmo preparado com uma linhagem de *S. enterica* Typhimurium.**

#### **4.1.5. Remoção do cassete de resistência**

Apesar da conveniência de se trabalhar com uma linhagem carregando uma marca de seleção de antibiótico, para poder adicionar novas deleções com o Sistema  $\Lambda$  Red usando o plasmídeo pKD3 é necessário remover o gene de resistência. Para isso, seguimos a estratégia proposta por Datsenko e Wanner (2000). O plasmídeo pCP20 foi eletroporado nas linhagens mutantes, a seleção foi feita crescendo 16h as culturas em placas de meio LB Amp e Cm a 30°C. As colônias obtidas foram transferidas para outra placa de LB Amp e Cm para confirmar a presença do plasmídeo. As colônias positivas foram inoculadas em alíquotas de 3ml de meio LB e crescidas 16h a 42°C, em seguida as culturas foram plaqueadas e as colônias isoladas

transferidas para placas de LB. As colônias foram então testadas em placas de LB Amp e LB Cm para verificar a resistência ou suscetibilidade a estes antibióticos.

Apenas para os mutantes  $\Delta fis$  colônias suscetíveis a ambos os antibióticos foram obtidas. Estas colônias foram testadas com a dupla de *primers* fisDT R/F. Se a etapa do pCP20 foi bem sucedida e houve a remoção do gene de resistência, é esperado um fragmento de ~250pb, se não houve a remoção o fragmento se mantém em ~1.5kpb. Foi possível encontrar colônias que apresentaram uma banda com o tamanho esperado para a remoção do gene de resistência, como mostrado na Figura 8.



**Figura 8: PCR confirmando a remoção do gene de resistência no mutante  $\Delta fis$ .** Na linhagem PT4. 1: Controle negativo. 2: Linhagem selvagem como controle positivo. 3:  $\Delta fis$  sem gene de resistência.

Para compreender a falta de sucesso na eletroporação do pCP20 nos mutantes  $\Delta ihfA$  e  $\Delta ihfB$ , voltamos para o conhecimento básico desses genes. Os genes IHF estão relacionados à replicação plasmidial, então checamos na literatura se estes genes poderiam estar envolvidos na

replicação de plasmídios com a origem de replicação derivada do pSC101 que foi usada na construção do pCP20. De fato, Cohen e Biek (1989) mostraram que os genes IHF são ambos necessários para a replicação do pSC101 em *E. coli*, explicando porque não obtivemos êxito na eletroporação de nossas linhagens mutantes nulos para IHF (subunidades A ou B) com pCP20.

#### **4.1.6. Remoção do cassete de resistência para os mutantes IHF**

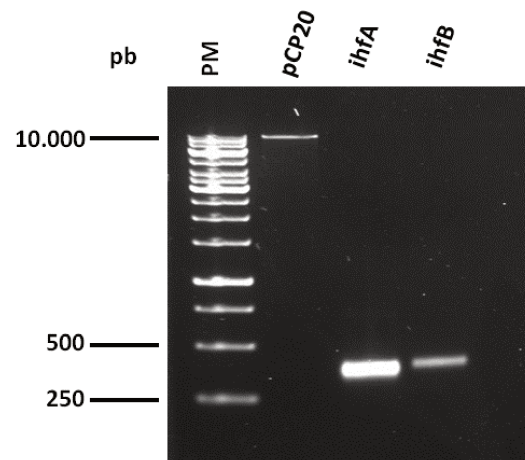
Para poder remover o gene de resistência decidimos clonar os genes *ihfA* e *ihfB* no plasmídio pCP20 para obter dois novos plasmídios, pCP20A e pCP20B, cada um contendo um dos genes IHF, respectivamente.

A estratégia de clonagem foi amplificar os genes IHF do DNA genômico de *S. enterica* LT2 adicionando sítios XhoI em ambas as extremidades para então serem clonados no sítio XhoI de pCP20. A região genômica para ambos os genes é bastante distinta, *ihfA* faz parte do *operon* da fenilalanil tRNA sintetase, sendo o terceiro gene *downstream* ao promotor, já *ihfB* não faz parte de nenhum *operon*.

Como pCP20 não é um plasmídio de expressão é necessário adicionar um promotor para cada gene clonado. Para *ihfB* pudemos desenhar *primers* amplificando sua região promotora junto com a região codificadora, mas isso não foi possível para *ihfA* devido a distancia entre o promotor e a sequência estrutural do gene. Para este caso optamos por desenhar um *primer* contendo um promotor constitutivo, no caso o promotor do gene da Beta-lactamase que garante resistência contra ampicilina. A sequência deste promotor foi obtida no site [partsregistry.org](http://partsregistry.org), que funciona como um depósito de sequências úteis para biologia sintética.

Como mostra a Figura 9, a amplificação de ambos os genes foi bem sucedida obtendo-se fragmentos do tamanho esperado, sendo também confirmada a presença de apenas um sítio de

restrição XhoI no pCP20, o que foi necessário devido a falta de mapas de restrição completos para este plasmídio. No momento trabalhamos na clonagem dos insertos no pCP20.



**Figura 9:** Gel de agarose 1%, mostrando o plasmídio pCP20 digerido com XhoI e fragmentos correspondendo aos *amplicons* de *ihfA* e *ihfB*.

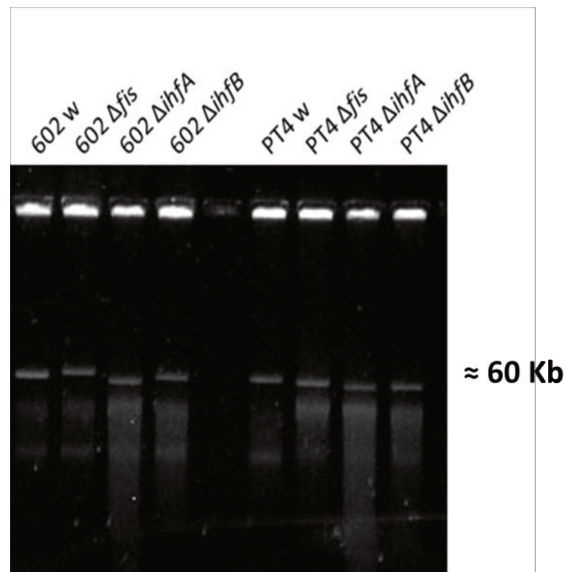
Várias tentativas de clonagem dos genes *ihfA* e *ihfB* no plasmídio pCP20 foram feitas, alterando diversas variáveis, como concentração do plasmídio e insertos, diferentes tempos de incubação e células competentes, porém não foi possível obter nenhuma colônia positiva.

Como outras clonagens estavam sendo realizadas concomitantemente e de forma bem sucedida, acreditamos que os motivos para a construção do plasmídio pCP20 com adição de *ihfA* e *ihfB* sejam relacionados à propriedades dos genes envolvidos.

#### 4.2. Plasmídio de Virulência

Devido a perda da capacidade de replicação do pCP20 pelos mutantes para os genes IHF, resolvemos analisar se os mesmos mutantes não poderiam perder a capacidade de replicar o plasmídio de virulência. Para isso, as linhagens mutantes foram submetidas a extração plasmidial

seguida de eletroforese em gel de agarose para verificar a presença dos plasmídios. Foi constatado que nenhuma das deleções implicou na perda da capacidade da bactéria de manter o plasmídio de virulência. Se isso de fato ocorresse, levaria a uma atenuação da virulência (Gulig e Curtiss, 1987). Os resultados exibidos estão representados na Figura 10.



**Figura 10.** Detecção do plasmídio de virulência de *S. enterica* Enteritidis selvagens (*w*) e mutantes nulos ( $\Delta$ ) para *fis*, *ihfA* e *ihfB*. DNA plasmidial foi extraído e avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,7%. Enteritidis possui um plasmídio de virulência de aproximadamente 60Kb, utilizamos as linhagens selvagens como marcadores.

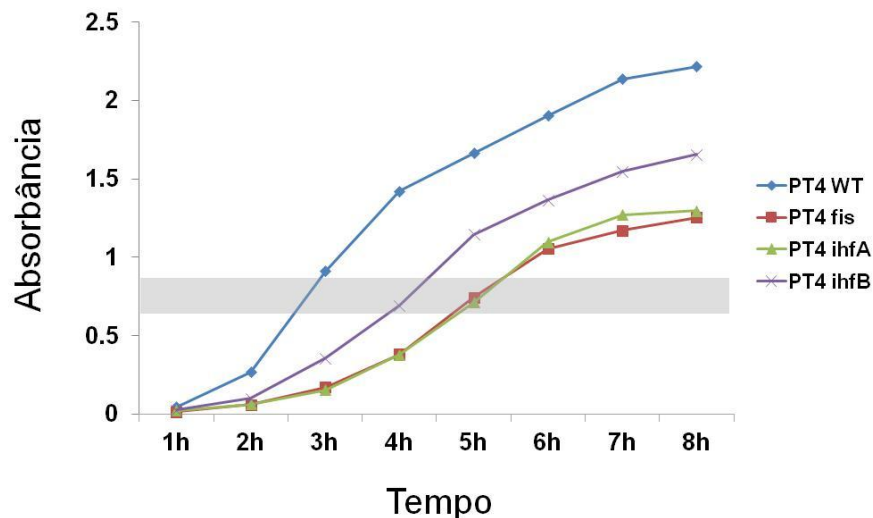
### 4.3. Curva de Crescimento

O crescimento das linhagens mutante e selvagens foi avaliado em meio LB com agitação pela estimativa da DO.

Como esperado, as linhagens mutantes apresentaram um atraso em seu crescimento com relação à linhagem selvagem (Figura 11). As linhagens  $\Delta fis$  e  $\Delta ihfA$  foram as que apresentaram



maior retardo no crescimento, enquanto  $\Delta ihfB$  apresentou um comportamento intermediário entre estas linhagens e a selvagem.



**Figura 11: Curva de crescimento das linhagens mutantes e selvagens.** O crescimento foi avaliado pela D.O. ao longo das coletas nos intervalos de uma hora. A faixa cinza indica a D. o. em que a cultura era coletada para a realização de experimentos.

Além de importante para caracterizar as linhagens, a curva de crescimento determina o tempo necessário para que as linhagens atinjam a fase exponencial que é utilizada para a realização dos experimentos em modelo animal. A faixa de absorvância em que as culturas são coletadas para os experimentos está indicada por uma faixa cinza (Figura 11).

#### 4.4. Determinação da Dose Letal Média (DL50)

As linhagens selvagens utilizadas neste projeto nunca haviam sido testadas em modelo animal e sua virulência era desconhecida. Assim, um teste piloto utilizando grupos de 3 camundongos BALB/c foi realizado para avaliar a patogenicidade em modelo animal.

Todas as linhagens utilizadas, SE602, SE672 e PT4 foram altamente virulentas. A DL<sub>50</sub> foi então determinada para PT4 e os respectivos mutantes nulos para *fis*, *ihfA* e *ihfB*, pois PT4 é a linhagem mais importante comercialmente e do ponto de vista epidemiológico. Estes experimentos foram realizados com 5 camundongos por grupo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** DL<sub>50</sub> de PT4 e mutantes  $\Delta fis$ ,  $\Delta ihfA$  e  $\Delta IhfB$

Linhagem	DL <sub>50</sub> (cfu)
PT4	$2.6 \cdot 10^3$
PT4 $\Delta fis$	$2.1 \cdot 10^4$
PT4 $ihfA$	$>10^9$
PT4 $ihfB$	$>10^9$

Legenda: DL50 – Dose letal Médica. cfu: Unidades formadoras de colônias.

A DL50 para a linhagem PT4  $\Delta fis$  apresentou um resultado bastante contrastante com o observado para Typhimurium (Pereira *et al.* não publicado). Decidimos repetir novamente o mesmo experimento repetindo SE PT4 e adicionando uma linhagem de Typhimurium.

Nesta repetição obtivemos resultados bastante similares (Tabela 5). As DL50's para os mutantes  $\Delta fis$  de Enteritidis e de Typhimurium foram bastante divergentes. Dentro do contexto em que o sorovar Typhimurium é mais estudado que Enteritidis, decidimos utilizar esse mutante para uma caracterização mais detalhada dentro do modelo de inflamação.

**Tabela 5.** DL<sub>50</sub> de PT4 e mutantes  $\Delta fis$ ,  $\Delta ihfA$  e  $\Delta ihfB$

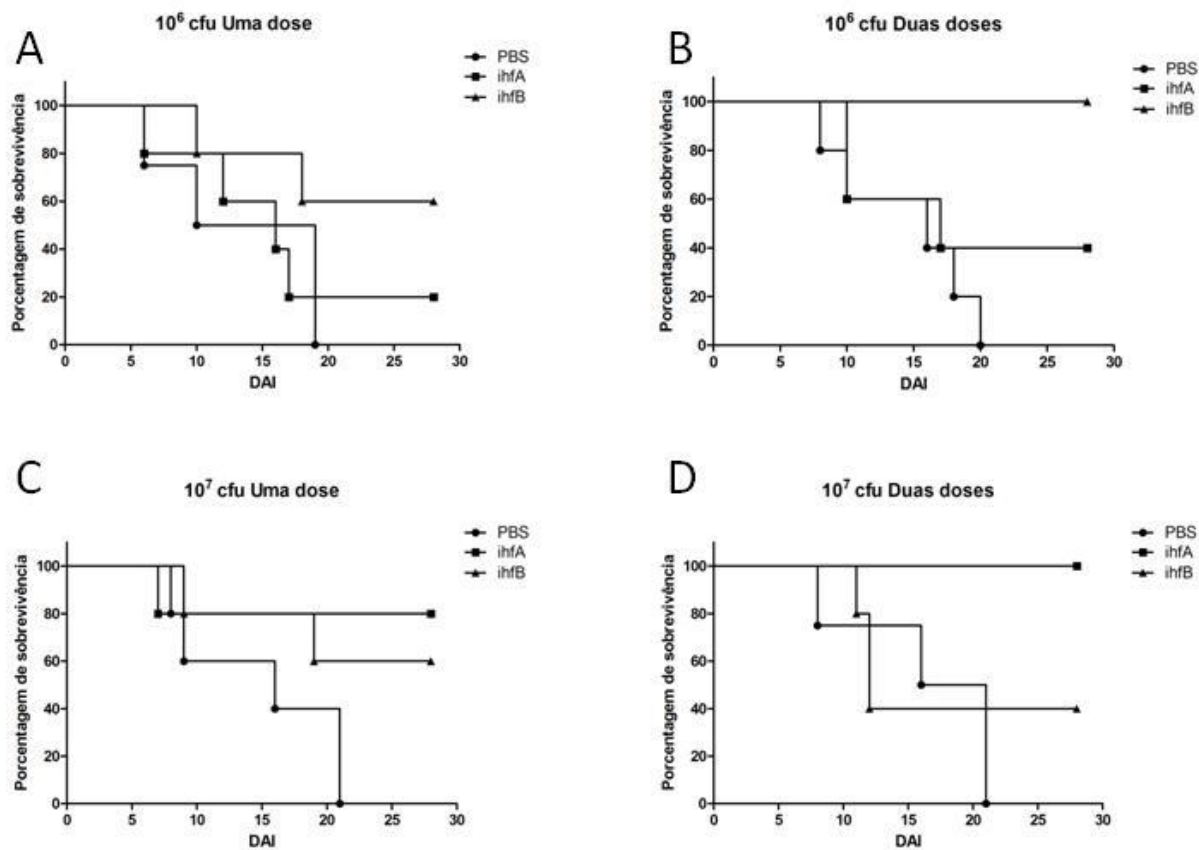
Linhagem	DL <sub>50</sub> (cfu)
PT4	$2.6 \cdot 10^3$
PT4 $\Delta fis$	$2.1 \cdot 10^4$
ST662	$5.2 \cdot 10^5$
ST662 $\Delta fis$	$>10^9$

Legenda: DL<sub>50</sub> – Dose letal Médica. cfu: Unidades formadoras de colônias.

#### 4.5. Desafio e Proteção

Nesta etapa do projeto, os mutantes  $\Delta fis$  não foram utilizados nos experimentos de proteção por serem pouco atenuados, mesmo com a deleção eles ainda apresentam um fenótipo virulento capaz de causar uma infecção com fatal com uma quantidade baixa de cfu.

O trabalho prosseguiu com os mutantes  $\Delta ihfA$  e  $\Delta ihfB$ . Para verificar a proteção induzida em camundongos BALB/c, grupo com 5 animais foram inoculados oralmente com as linhagens mutante utilizando apenas uma por tratamento. Foram feitos experimentos com uma inoculação e duas inoculações, para a última foi utilizado um intervalo de 14 dias entre elas. A quantidade de bactérias inoculadas foi testada para  $10^7$  cfu ou  $10^6$  cfu. Um intervalo de 28 dias após o último inóculo foi dado antes de desafiar os animais com  $10^5$  cfu da linhagem selvagem. Um controle negativo foi feito inoculando PBS esterilizado no lugar das linhagens mutantes. Os resultados estão apresentados na (Figura 12).

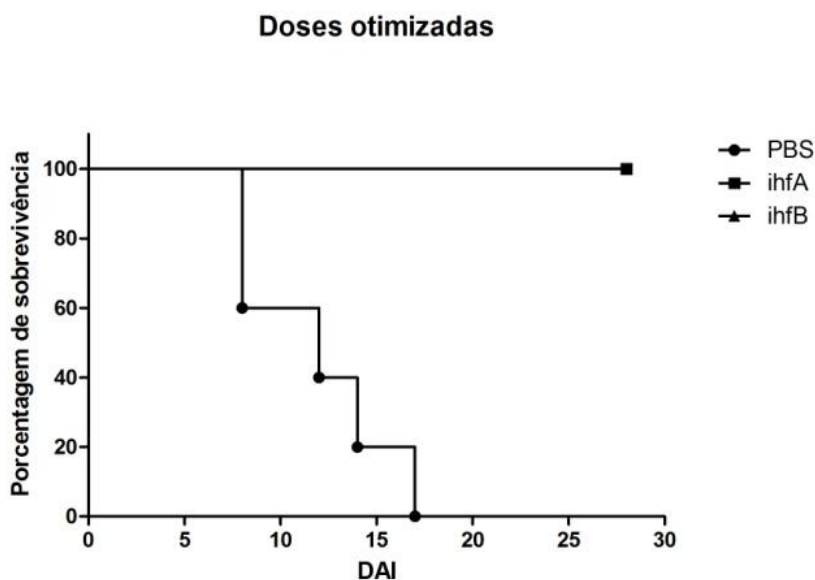


**Figura 12:** Gráficos representando a sobrevivência dos animais após o desafio durante 28 dias. Painéis A e B: Dose de proteção,  $10^6$  cfu. Painéis C e D: Dose de proteção,  $10^7$  cfu. Painéis A e C: Dose única de proteção. Painéis B e D duas doses de proteção.

Os resultados obtidos indicam que mutantes  $\Delta ihfA$  e  $\Delta ihfB$  de *S. enterica* Enteritidis PT4 são imunogênicos e conferem proteção no modelo murino de infecção. A imunização com duas doses de  $10^7$  cfu de PT4 $\Delta ihfA$  conferiu 100% de proteção e o experimento realizado com duas doses de  $10^6$  cfu de PT4 $\Delta ihfB$  também resultou em 100% de proteção.

Um novo experimento de desafio foi feito utilizando o tratamento que apresentou o melhor resultado para cada mutante, doses duplas para cada mutante com  $10^7$  cfu de PT4 $\Delta ihfA$  e

$10^6$  cfu de PT4 $\Delta$ ihfB. O resultado obtido foi novamente 100% de proteção para os dois tratamentos confirmando a potencial protetor das linhagens (Figura 13).

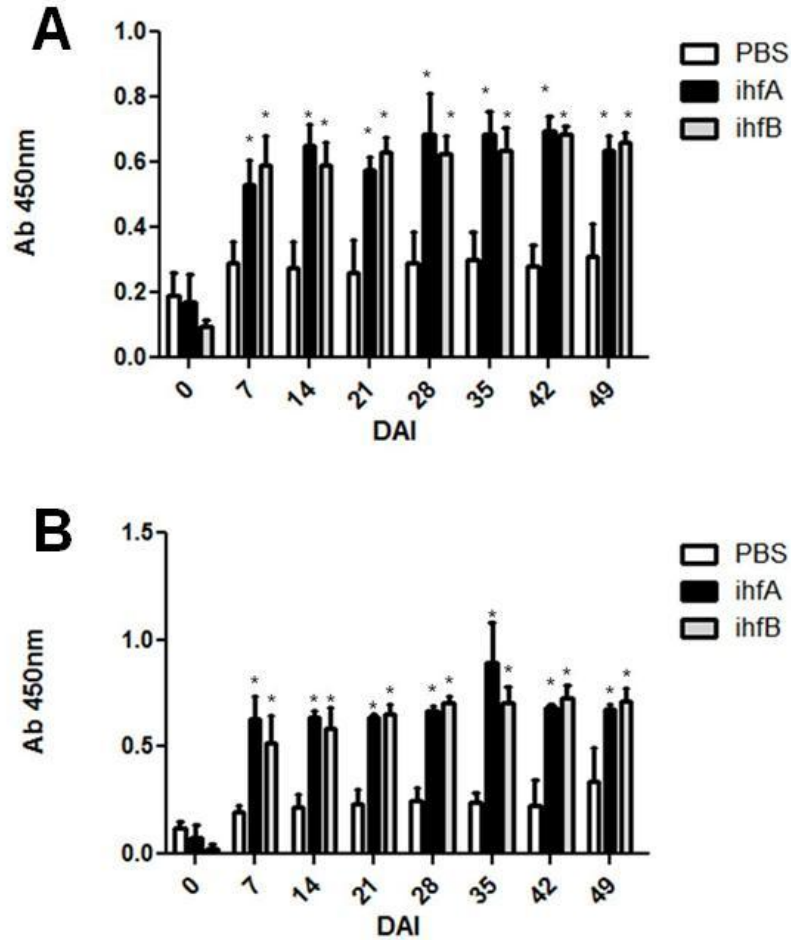


**Figura 13:** Gráficos representando a sobrevivência dos animais após o desafio durante 28 dias.

#### 4.6. Detecção de Ig's por ELISA

Para avaliar a resposta humoral foi feita a quantificação de anticorpos específicos contra *Salmonella*, para isso foram utilizadas as imunizações mais eficientes para cada linhagem: Doses duplas para cada mutante com  $10^7$  cfu de PT4  $\Delta$ ihfA e  $10^6$  cfu de PT4  $\Delta$ ihfB. Grupos de 7 animais foram imunizados e antes do tratamento e após a última inoculação, sangue e fezes foram coletados durante 49 dias com intervalos de uma semana. Como controle, foi utilizado um grupo inoculado com apenas PBS.

A partir do soro foi quantificado IgG total, IgG2a e IgG1, e as nas fezes foram quantificados IgA. O IgG total e IgG2a apresentaram uma resposta esperada após a imunização (Figura 14). A produção destes anticorpos foi maior que o pré-imune.



**Figura 14:** Quantificação de IgG totais e IgG2a para os animais tratados com apenas PBS (controle negativo) e com as linhagens atenuadas. O ponto 0 representa a coleta pré imune e 7 após última imunização. A produção de IgG total e IgG2a foi estatisticamente significante (One way – ANOVA. Post-hoc Tukey; \* $p < 0,05$  ).

#### 4.7. Modelo de inflamação.

Para iniciar o experimento fizemos um piloto, nele 6 camundongos C57B/6 fêmeas foram inoculados por gavagem gástrica com 20mg de estreptomicina e 24h depois foram divididos em 2 grupos (n=3), sendo um deles o controle negativo, inoculado com PBS e o outro inoculado com  $10^8$  cfu de SE PT4. O ceco dos animais foi coletado após 3,4 e 5 dias. Na primeira coleta não foi possível observar nenhuma diferença entre os animais tratados e controle negativo, porém a partir do 4º dia foi evidente a diferença entre os camundongos tratados e o controle negativo. Os animais tratados apresentaram a morfopatologia típica de inflamação com eliminação de material fecal e redução no tamanho ceco, corroborando os resultados obtidos em outros trabalhos que utilizam o mesmo modelo (Barthel *et al.*, 2003; Suar *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2010) Os resultados estão apresentados na Figura 15.

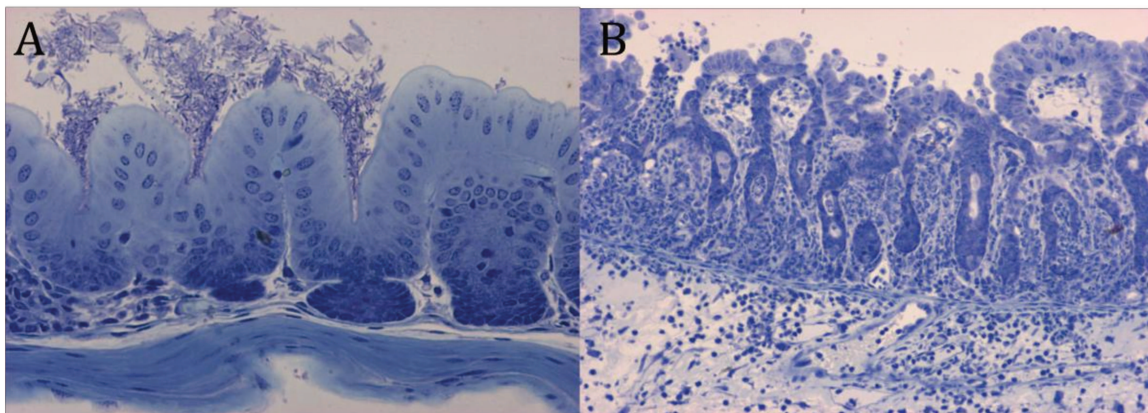


**Figura 15: Ceco de camundongos C57B/6 tratados com Enteritidis ou PBS (PBS) no modelo de gastroenterite.**

Este primeiro resultado foi utilizado como base para os experimentos seguintes. Com o estabelecimento do dia em que a inflamação fica evidente, repetimos o experimento com grupos

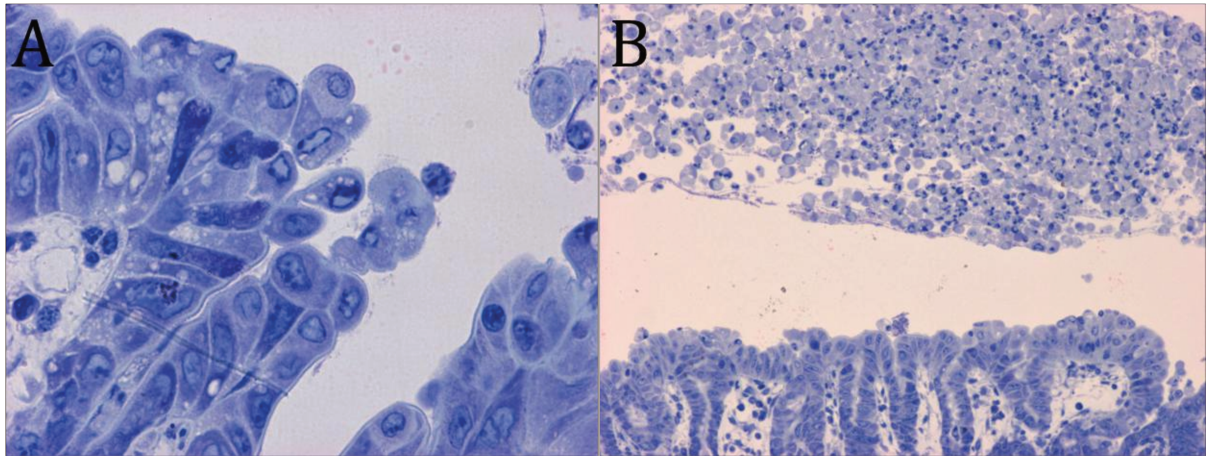
de 5 animais e os tratamentos foram feitos utilizando um controle negativo e diferentes linhagens de *S. enterica*. As linhagens usadas foram SE PT4 wt, SE PT4  $\Delta fis$ , ST 662 wt e ST 662  $\Delta fis$  todas inoculadas com  $10^8$ UFC.

No quarto dia após o tratamento, os cecos foram coletados fixados, para posterior emblocamento em historesina e coloração com Rosenfeld. As diferenças histógicas mais salientes foram entre o controle negativo e SE PT4 selvagem (Figura 16). A análise histológica ceco permite a quantificação da inflamação através da análise de parâmetros como: Descamamento da mucosa e número de células cálice (Figura 17A), presença de células na luz do órgão (Figura 17B), espessura da submucosa e presença de células polimorfonucleares (Figura 18A) e, presença de MALT (Figura 18B).

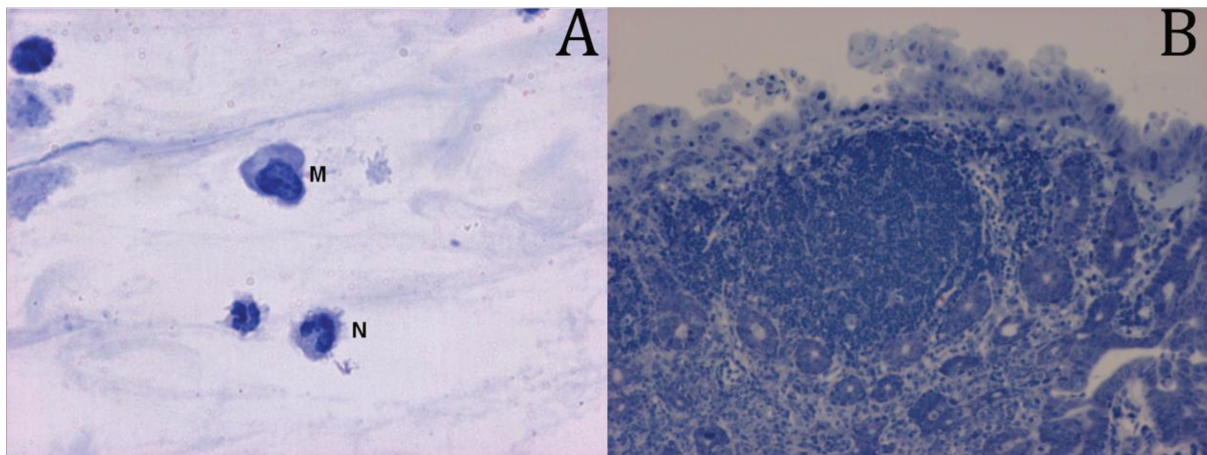


**Figura 16: Comparação entre tratamento negativo (A) e tratamento com SE PT4 (B).**





**Figura 17: Corte do ceco tratado com PT4 w mostrando descamação.** A: Descamamento da mucosa. B: Células na luz do órgão.



**Figura 18: Corte do ceco tratado com PT4 w mostrando células do sistema imune.** A: Prováveis células fagocitárias na submucosa, M: monócito, N: Neutrófilo. B: MALT na submucosa.

## 5. Discussão

Hoje, o cenário é bastante favorável para o desenvolvimento de vacinas atenuadas contra *S. enterica* Enteritidis; existe a necessidade de se vacinar frangos contra esta bactéria, existe uma tecnologia robusta para o desenvolvimento dessas vacinas e a legislação está sendo alterada para o uso dessa tecnologia.

Este projeto teve como objetivo geral desenvolver linhagens atenuadas de *S. enterica* Enteritidis através da deleção de três genes: *ihfA*, *ihfB* e *fis*, para então caracteriza-los avaliando seu potencial protetor e no caso do gene *fis*, compreender melhor seu papel na patogênese dos serovares Typhimurium e Enteritidis.

A deleção foi feita usando o sistema  $\lambda$  Red que se mostrou muito efetivo. Esse processo ocorreu de forma rápida e em menos de um mês todos os mutantes foram obtidos e confirmados.

A transdução para os mutantes IHF não ocorreu com a mesma facilidade. Como demonstramos, a eficiência de transdução é mais baixa para o serovar Enteritidis e ainda menor para os mutantes desenvolvidos nesse projeto. A provável razão para a diferença entre as sorovarietes na transdução se deve a diferenças no LPS que é o alvo para o P22 se ancorar nas células.

Como os três genes deletados são NAP's, não foi uma total surpresa observar uma redução na eficiência da transdução para estes mutantes, especialmente para os genes de IHF que já tiveram sua infecção pelo P22 estudada e foi mostrado que eles produzem menos partículas virais por célula (Cho *et al.* 1999)

Problemas relacionados com as propriedades de IHF também foram encontrados quando tentamos eletroporar o pCP20 nessas linhagens mutantes que não foram capazes de carrear o plasmídeo. Isso provavelmente ocorreu porque os genes *ihfA* e *ihfB* são essenciais para a

replicação do pSC101 (Cohen e Biek 1989) que foi usado na construção de pCP20. O trabalho de Cohen e Biek 1989 também demonstraram que mutações secundárias no gene *topA* podem recuperar a capacidade da bactéria de replicar estes plasmídios, isso pode fazer com que sucessivas tentativas de eletroporar pCP20 resultasse na obtenção de linhagens com mutações secundárias indesejadas que poderiam prejudicar toda a caracterização das linhagens.

Para permitir a replicação de pCP20 nos mutantes IHF, tentamos clonar *ihfA* e *ihfB* diretamente neste plasmídio, na expectativa de que tendo a capacidade de produzir estas proteínas o plasmídio recuperasse a capacidade de replicação nos mutantes, porém não foi possível obter tais construções. Uma das possibilidades é que ao clonar um dos genes IHF em pCP20 sua expressão aumente em relação ao normal devido ao número de cópias do plasmídio. Com esse aumento da expressão, mais subunidades de *ihfA* ou *ihfB* se acumulariam na célula, aumentando a formação de homodímeros que agiriam como um mutante, impossibilitando a replicação de pCP20 e inviabilizando a clonagem.

*S. enterica* possui um plasmídio de virulência que está envolvido nas características desse organismo, com os problemas de replicação relacionados ao pCP20, levantamos a possibilidade de que nossas linhagens também pudessem ter perdido esse plasmídio, mas provamos que o plasmídio de virulência se manteve para todas as linhagens recombinantes. No entanto, foram observadas diferenças entre linhagens mutantes e selvagens quanto à migração do plasmídio em gel de agarose, o que pode indicar que estes mutantes levem a uma alteração no estado de enovelamento plasmidial. De fato, algumas NAPs modulam o estado de *supercoiling* o que poderia explicar tais resultados (Dillon e Dorman, 2010). Além disso, as variações de perfil eletroforético podem ser devido a não ligação das NAP ausentes ao DNA plasmidial. De fato, a

simples visualização em gel de agarose é apenas sugestiva de alterações no *link number* e experimentos adicionais serão realizados para verificar esta questão.

A primeira caracterização das linhagens recombinantes foi a a curva de crescimento, além de prover um dado sobre a biologia básica das linhagens esse experimento é útil para definir o tempo necessário de crescimento para cada linhagem atingir a faixa de DO 600 entre 0,6 e 0,8 quando a cultura é usada para os experimentos.

Foi observado que as linhagens mutantes apresentaram um claro retardo de crescimento com relação ao selvagem. A curva de crescimento das linhagens SE PT4  $\Delta$  *ihfA* e SE PT4  $\Delta$  *ihfB* já haviam sido descritas (Mangan *et al.* 2006) sem retardo no crescimento com relação á selvagem, provavelmente essa discrepância entre esses estudo e o nosso se deve a variabilidade genética presente entre as linhagens estudadas. O retardo no crescimento do mutante  $\Delta$  *fis* foi próximo ao descrito previamente (Osuma, 1995). Todos os genes estudados estão envolvidos em funções celulares básicas requeridas na divisão celular, como a transcrição e replicação de DNA (Dillon e Dorman, 2010). Assim é possível que estes efeitos globais e não específicos tenham influenciado o crescimento celular.

Após a etapa de construção dos mutantes, foram feitos os experimentos *in vivo* que são os mais relevantes par ao nosso trabalho, dado que eles irão indicar o potencial vacinal das nossas linhagens.

No início trabalhamos com 3 linhagens de SE, os isolados clínicos 602 e 672 e a linhagem SE PT4 cedida pela empresa Biovet. Desenvolver todo o trabalho com 3 linhagens seria muito oneroso, mas como nenhuma destas linhagens havia sido descrita no modelo animal, optamos por um experimento prévio de DL50 para avaliarmos se as linhagens eram virulentas no modelo murino e se adequariam às necessidades experimentais.

Todas as 3 linhagens apresentaram resultados muito semelhantes quanto a DL50, todas foram virulentas e desenvolveram uma infecção sistêmica letal, tendo a DL50 em torno de  $10^3$  cfu.

Optamos por prosseguir os experimentos com a linhagem PT4. Essa determinação foi feita por dois motivos: É uma linhagem já utilizada para a produção de vacinas inativadas, já possui um histórico de uso vacinal, e também é a única linhagem que temos disponível com o fagotipo definido e é justamente o envolvido na maior parte dos casos de salmonelose.

Como mostrado na Tabela 3, os mutantes nulos para *ihfA* e *ihfB* foram bastante atenuados, uma vez que a diferença entre a DL50 da linhagem selvagem para as mutantes foi de  $10^6$ UFC ou mais, pois não atingimos uma dose capaz de matar os animais. Estes dados são condizentes com a importância destas NAPs no metabolismo bacteriano e sua ausência está associada a diversos efeitos pleotrópicos (Mangan *et al.*, 2006).

Para o mutante  $\Delta fis$  a atenuação foi de apenas  $10^2$  cfu, o que foi bastante contrastante com o sorovar Typhimurium, estudado previamente pelo nosso grupo (Pereira *et al.*, não publicado), em que inoculando os animais com  $10^{10}$  cfu não havia óbito de todos os animais do grupo. Com a repetição do experimento e desta vez adicionando o sorovar Typhimurium, obtivemos novamente o mesmo resultado Tabela 4.

O gene *fis* é um dos principais reguladores da expressão gênica da SPI-1 e SPI-2 (Cameron e Dorman 2012; Osborne *et al.* 2011; Cróinín *et al.* 2006) que são mecanismos base da patogenicidade de *S. enterica* responsáveis por fases chaves da infecção; invasão do epitélio intestinal e invasão e sobrevivência em macrófagos. Estes mecanismos são comuns para ambas as sorovariades o que torna a discrepância entre elas uma abertura para mecanismos paralelos de patogênese.

Uma possível explicação para essa divergência está na genética da *S. enterica*. Enteritidis possui genes e ilhas genômicas não encontrados em outras sorovariedades que quando são deletados induzem uma forte atenuação (Silva *et al.* 2012). Esse grupo de genes e ilha genômicas é bastante heterogêneo, inclui um sistema Tipo 1 de restrição/Modificação, um operon fimbrial, uma ilha de patogenicidade putativa e um remanescente de Sistema de Secreção Tipo IV. Ainda não há total compreensão sobre o papel desses novos fatores de virulência no desenvolvimento da infecção, mas é possível que eles possam estar compensando de alguma forma outros fatores como SPI-1 e SPI-2 que sejam dependentes de *fis* e que são essenciais para Typhimurium.

Escolhemos utilizar os mutantes  $\Delta fis$  para serem analisados no modelo de inflamação. Este modelo é mais próximo da maior parte dos casos de salmonelose nos quais se desenvolve uma gastroenterite e não uma infecção sistêmica. Neste modelo primeiramente descrito por (Barthel 2003), um pré-tratamento com estreptomicina remove parte da microbiota intestinal facilitando a colonização do epitélio por *S. enterica*. O animal utilizado é o camundongo C57BL/6 que diferente do BALB/C, não desenvolve uma infecção sistêmica, limitando-a ao lúmen intestinal. Este modelo foi estabelecido primeiramente para o serovar Typhimurium (Barthel *et al.* 2003) e já foi utilizado para outros serovares, incluindo Enteritidis, Dublin e Pullorum (Suar *et al.* 2006).

Utilizando a linhagem SE PT4 pudemos estabelecer o modelo de inflamação. No tratamento com a linhagem selvagem foi possível observar toda a morfopatologia esperada para a inflamação; ocorreu o espessamento da mucosa, invasão de células polimorfonucleares, descamamento do epitélio, presença de MALT e redução no número de células cálice.

Acreditamos que o desenvolvimento deste modelo para caracterizar as linhagens desenvolvidas nesse projeto irá ampliar nosso conhecimento sobre os genes deletados, pois este

modelo oferece uma simulação mais próxima da gastroenterite que é a realidade na maioria dos casos de salmonelose que acometem os seres humanos.

Como o mutante SE PT4  $\Delta fis$  foi pouco atenuado, não o utilizamos para os experimentos de proteção, pois mesmo inoculando os animais com poucos cfu já havia risco de se desenvolver uma infecção letal nos animais. Utilizamos apenas os mutantes SE PT4  $\Delta ihfA$  e SE PT4 $\Delta ihfB$  para tais experimentos.

Os resultados obtidos mostram que as linhagens SE PT4  $\Delta ihfA$  e SE PT4  $\Delta ihfB$  de *S. enterica* Enteritidis PT4 são imunogênicos e conferem proteção no modelo murino de infecção. A imunização com duas doses de  $10^7$  cfu de SE PT4 $\Delta ihfA$  conferiu 100% de proteção e o experimento realizado com duas doses de  $10^6$  cfu de SE PT4 $\Delta ihfB$  também resultou em 100% de proteção

Curiosamente, inoculando menos UFC de SE PT4  $\Delta ihfB$  obtivemos maior proteção. Também observamos que os mutantes SE PT4  $\Delta ihfB$  causam uma sintomatologia mais proeminente após a administração das duas doses vacinais com  $10^7$  cfu, indicando que tais mutantes tem um nível de atenuação menor do que mutantes SE PT4  $\Delta ihfA$ , mesmo não causando uma infecção sistêmica letal, este mutante deve estar afetando a saúde do animal. Assim, no momento do desafio, os animais imunizados com PT4 $\Delta ihfB$  estavam mais debilitados e mais suscetíveis a infecção com a linhagem selvagem, quando comparados aos animais imunizados com SE PT4 $\Delta ihfA$ , o que explicaria a maior mortalidade, a despeito da indução de reposta imune. De fato, animais imunizados com uma única dose de SE PT4 $\Delta ihfB$   $10^7$  cfu apresentaram taxa de sobrevivência superior aos imunizados com SE PT4 $\Delta ihfA$ . Porém no tratamento com duas doses a redução de  $10^7$  cfu para  $10^6$  cfu de PT4  $\Delta ihfB$  elevou a proteção para 100%, indicando que nessa dose a linhagem mantém potencial imunogênico porém não

debilita o animal. Apesar de tais diferenças, os resultados indicam potencial vacinal para ambos os mutantes.

Os resultados de proteção foram compatíveis com o alto título de IgG e IgG2a induzidos após a última inoculação das linhagens recombinantes. O título de IgG e IgG2a foi alto para ambas as linhagens, sem nenhuma diferença significativa entre elas, mostrando que imunologicamente  $\Delta ihfA$  e  $ihfB$  são eficientes na indução da resposta humoral.

Outras linhagens atenuadas de *S. enterica* também apresentam respostas semelhantes com a indução de IgG e IgG2a (Lange *et al.* 2004 e Oliveira *et al.* 2007). Estes estudos abrangeram outros marcadores imunológicos como a produção de IFN- $\gamma$  que está relacionado ao aumento da produção de IgG2a e resposta dependente de Th1, mas apesar desses indícios a quantificação de IgG1 não foi bem sucedida, impossibilitando a determinação de qual dos IgG's foi preferencialmente expresso.

Os experimentos *in vivo* mostraram que as linhagens SE PT4  $\Delta ihfA$  e SE PT4  $ihfB$  possuem grande potencial para uso vacinal, pois elas são capazes de induzir uma proteção ampla e duradoura contra *S. enterica*. Recentemente a Unicamp fechou um convênio com a Empresa Biovet no sentido de testar as linhagens vacinais em aves, utilizando as dependências da Empresa em Vargem Grande Paulista e Cotia, São Paulo. Esta empresa já iniciou os testes em frangos e tem obtido resultados promissores com a linhagem SE PT4  $\Delta ihfA$ .



## 6. Conclusão

1. O sistema  $\Lambda$  Red (Datsenko e Werner 2001) é bastante efetivo para a deleção de genes em *S. enterica* Enteritidis
2. Transdução pelo fago P22 pode ser problemática quando utilizado no serovar Enteritidis devido a pouca especificidade deste fago por este serovar
3. Mutantes para os genes IHF, assim como descrito para *E. coli*, não são capazes de replicar plasmídeos com origem de replicação derivada de pSC101
4. Mutantes para os genes *ihfA*, *ihfB* e *fis* apresentam redução no crescimento quando comparadas com selvagem
5. A linhagem SE PT4 é altamente virulenta no modelo murino de infecção sistêmica
6. A linhagem SE PT4  $\Delta$  *fis* é pouco atenuada no modelo murino de infecção sistêmica, já as linhagens SE PT4  $\Delta$  *ihfA* e  $\Delta$  *ihfB* são altamente atenuadas.
7. As linhagens SE PT4  $\Delta$  *ihfA* e  $\Delta$  *ihfB* são capazes de proteger contra doses letais de *S. enterica* Enteritidis PT4
8. As linhagens SE PT4  $\Delta$  *ihfA* e  $\Delta$  *ihfB* induzem a produção de IgG totais e IgG2a
9. O modelo murino de inflamação pode ser usado para *S. enterica* PT4 e oferece perspectivas para o estudo dos mutantes desenvolvidos nesse trabalho.

## 7. Apêndice 1: Atenuação regulada.

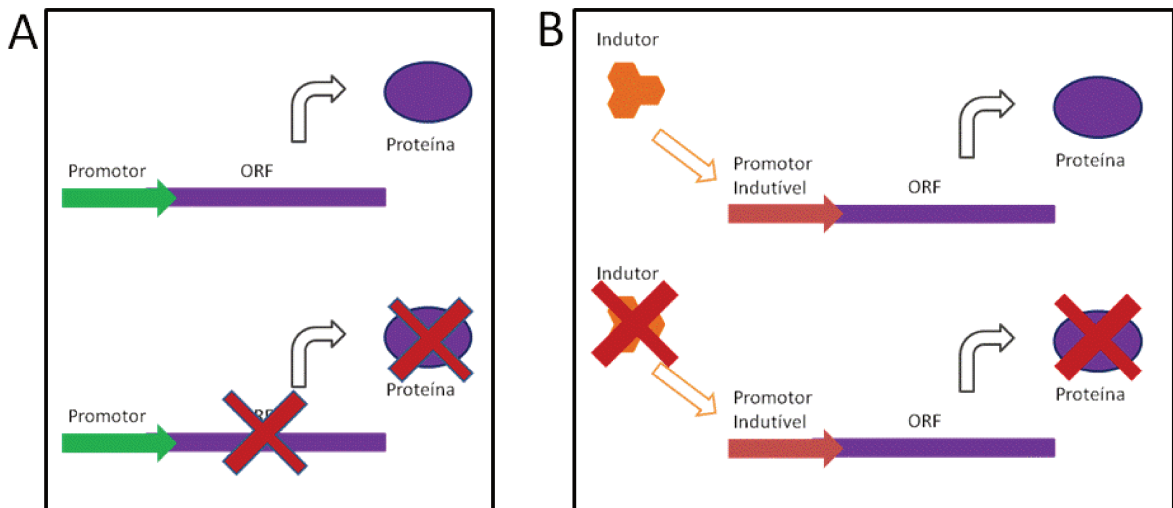
### 7.1. Plasmídios da atenuação regulada

Recentemente a tecnologia de vacinas recombinantes de *S. enterica*, teve um grande avanço com o desenvolvimento do sistema de atenuação regulada, descrito inicialmente por Curtiss III *et al.* (2009). Neste sistema, representado na Figura 19, ao invés de se deletar um gene, o seu promotor é substituído por outro que seja induzível por um indutor. A cultura utilizada na vacinação é crescida na presença deste indutor e assim realiza a expressão do gene de interesse adquirindo o fenótipo selvagem, mas após a administração da bactéria no animal, a ausência deste indutor no organismo do hospedeiro faz com que a bactéria o deplete ao longo de suas divisões e assim paulatinamente reduz a expressão do gene de interesse, adquirindo o fenótipo mutante de forma gradual.

As vantagens da regulação atenuada incluem a capacidade de se manipular mais de um gene sem resultar em uma linhagem excessivamente atenuada e sem capacidade de induzir uma resposta imune e linhagens que utilizam esse sistema podem apresentar uma resposta imune mais intensa e efetiva, pois em seu primeiro contato com o sistema imune do animal ela estará expressando o fenótipo selvagem e mais patogênico. O sistema de atenuação regulada tem se mostrado eficiente e já foi aplicado para diversos genes e associado a outros mecanismos como o de expressão e lise controlada atenuação (Curtiss *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009, Juárez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Aproveitamos o avanço deste projeto que gerou duas linhagens atenuadas com alto potencial vacinal para iniciar o trabalho com o sistema de atenuação regulada em nosso laboratório. As construções desenvolvidas pelo grupo do Prof. Curtis III utilizam o promotor

indutível da arabinose,  $P_{BAD}$ , e as inserções genômicas são feitas através de transposons. Para se adequar melhor às tecnologias que utilizamos, desenvolvemos um sistema que utiliza  $P_{BAD}$  associado ao plasmídio pKD3 que é utilizado no sistema  $\lambda$  Red, dessa forma poderíamos utilizar o mesmo sistema de recombinação homóloga que temos utilizado em nosso laboratório para construir as linhagens com o sistema de atenuação regulada.



**Figura 19:** Painel A: Sistema convencional, a ORF é deletada resultando na perda da proteína que resulta no fenótipo mutante. Painel B: Sistema de atenuação regulada: O promotor selvagem é trocado por um indutível e a bactéria é cultivada com o indutor específico para este promotor. Após ser inoculada no animal a bactéria adquire paulatinamente o fenótipo mutante através da depleção do indutor que resulta na inibição da transcrição.

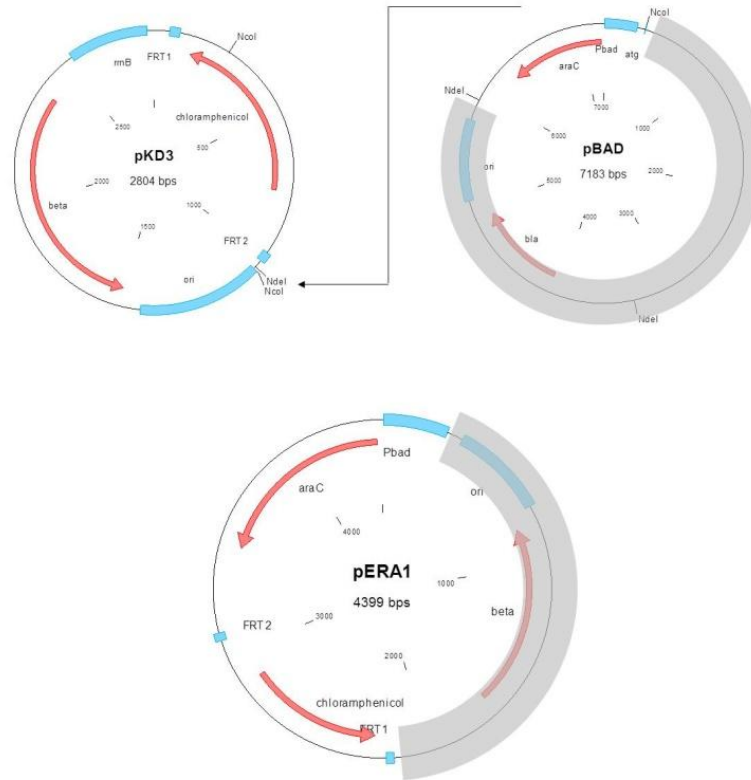
Na estratégia de clonagem apresentada na Figura 20, é clonado o fragmento do plasmídio pBAD que contém o promotor  $P_{BAD}$  e seu controlador *araC*, no plasmídio pKD3, para isso utilizaremos os sítios de restrição NcoI e NdeI presentes em ambos os plasmídios. Como pKD3

possui dois sítios NcoI, será necessário a remoção de um destes sítios para realizar a clonagem, para esta remoção adotados dois métodos, *megaprimer* e mutagênese por PCR. O plasmídio resultante chamado de pERA1 (plasmídio de expressão regulada por arabinose, 1) com a parte funcional contendo o gene de resistência ao clorofenicol, *cat*, flanqueado pelas regiões FRT que permitem a remoção da resistência pela FLP recombinase, seguido do gene *araC* e o promotor  $P_{BAD}$ , essa região é a que será amplificada por PCR adicionando a sequência homóloga a região genômica em que será inserido.

Para o sistema de atenuação regulada ser mais eficiente, são necessárias duas modificações na linhagem que receberá o sistema, essas modificações são a deleção do operon *araBAD*, responsável pelo uso da arabinose, e do gene *araE* que codifica para um transportador de arabinose que funciona nos dois sentidos. Essas deleções resultam em uma linhagem que pode captar, mas não utilizar a arabinose, aumentando o tempo em que a presença intracelular deste indutor permanece na célula mantendo ativa a transcrição sobre controle do  $P_{BAD}$ .

Esta parte do projeto não foi inicialmente prevista, porém ela representa uma forma de manter nosso laboratório atualizado na área, trabalhando com as tecnologias mais avançadas, além de ser uma forma de treinamento mais amplo na biologia molecular.

O primeiro passo para o desenvolvimento da atenuação regulada é a remoção de um sítio NcoI no plasmídio pKD3. A primeira tentativa de remover este sítio foi feita utilizando a técnica *megaprimer*.

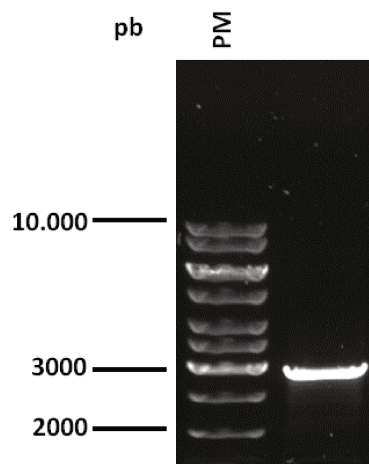


**Figura 20: Representação dos plasmídios pKD3, pBAD e pERA1.** Bla: Beta-lactamase (resistência a ampicilina). Cat: clorofenicol acetil transferase (resistência a clorofenicol). FRT1-2: Regiões reconhecidas pela FLP recombinase. araC: Controlador do promotor P<sub>BAD</sub>. Região não marcada em cinza: região funcional do plasmídio.

A síntese do *megaprimer* foi facilmente padronizada utilizando os *primers* megaf e r (tabela 3), permitindo a obtenção por PCR de um fragmento único de tamanho esperado. O segundo PCR utilizando o *megaprimer* e Mega2 foi feito testando diferentes condições, com temperatura de anelamento variando entre 50°C a 62°C, concentração do *megaprimer* variando entre 100ng a 500ng de DNA e diferentes concentrações de magnésio. Apesar de todas as

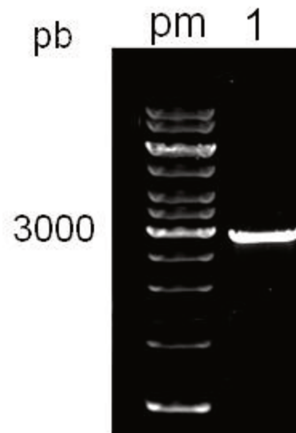
tentativas, não foi possível obter nenhum fragmento com tamanho esperado (dados não mostrados).

Passamos a utilizar a uma nova estratégia de clonagem para a remoção do sítio NcoI, através de mutagênese, linearizando o plasmídio por PCR utilizando para isso um par de *primers* com a base modificada (pera1-F/ R) e recircularização por tratamento com T4 DNA ligase. Este PCR foi facilmente padronizado, produzindo um fragmento com o tamanho esperado para o plasmídio linearizado (Figura 13).



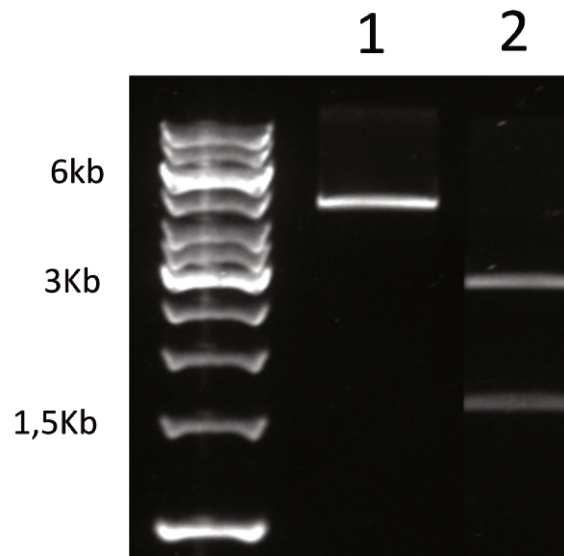
**Figura 16:** Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do plasmídio pKD3.

A religação desse fragmento foi feita e a confirmação da remoção do sítio NcoI foi feita através da digestão com essa enzima que resultou em apenas um fragmento, como o esperado para um plasmídio com apenas um sítio de restrição. Figura 16. Passamos a chamar o plasmídio pKD3 com um sítio NcoI de pERA0 ( plasmídio de expressão regulada por arabinose 0)



**Figura 17:** Gel de agarose 1% mostrando a restrição de pKD3 com NcoI. PM: marcador de peso molecular; 1: pKD3 digerido com NcoI.

Após a obtenção do plasmídeo pERA0, foi possível clonar o fragmento de pBAD contendo *araC* e o promotor pBAD, resultando no plasmídeo pERA1. A confirmação da clonagem foi feita digerindo os plasmídios obtidos com NdeI e NdeI com NcoI. Figura 13.

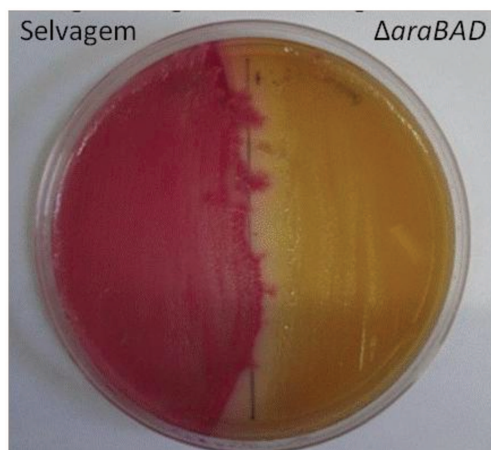


**Figura 18.** Confirmação da clonagem de pERA0 com pBAD. 1: digestão de pERA1 com NdeI, 2: Digestão de pERA1 com NdeI e NcoI.

Atualmente estamos trabalhando na transformação das linhagens de *S. enterica* para a substituição do promotor selvagem, pelo da atenuação regulada.

## 7.2. Marcador araBAD

O sistema de atenuação regulada precisa ser construído em uma linhagem  $\Delta araE$  e  $\Delta araBAD$  para evitar depleção e consumo de arabinose. Utilizando o Sistema  $\Lambda$  Red com os primers araBAD f e r, pudemos deletar o operon  $\Delta araBAD$  realizando a confirmação genotípica por PCR e fenotípica pelo cultivo em meio MacConkey enriquecido com Arabinose (1%) (Figura 21). A capacidade de distinguir a linhagem  $\Delta araBAD$  em MacConkey Arabinose (1%) possui grande potencial para ser utilizado como marcador, permitindo a distinção entre as linhagens recombinantes e selvagens. A possibilidade de fazer essa distinção de forma simples é necessária considerando que em breve nossas linhagens passarão por testes de campo e possuem o potencial para ir ao mercado, sendo esta distinção uma das exigências para a transferência.



**Figura 21:** Meio MacConkey Arabinose (1%) com culturas de SE PT4 e SE PT4  $\Delta araBAD$ .



## 8. Bibliografia

- Ali-Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama A. 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol* 181: 6361–70.
- Ali BM AR, Braslavsky I, Oppenheim AB, Gileadi O, Stavans J. 2001. Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10658–63.
- Allam US, Krishna MG, Lahiri A, Joy O, Chakravorty D. 2011. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking hfq gene confers protective immunity against murine typhoid. *PLoS One*. 6(2):e16667.
- Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med*. 179: 601- 8.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 2007. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- Avila, L.A., 2005. Redução da contaminação por *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte. , 68-81.
- Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun*. 66:4579-87.
- Bäumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*. 64: 1862-5.
- Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Rüssmann H, Hardt WD. 2003. Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host. *Infect Immun*.71(5):2839-58
- Biedzka-Sarek M, El Skurnik M. 2006. How to outwit the enemy: dendritic cells face *Salmonella*. *APMIS* 114: 589-600.
- Biek, DP, SN Cohen. 1989. Involvement of integration host factor (IHF) in maintenance of plasmid pSC101 in *Escherichia coli*: mutations in the *topA* gene allow pSC101 replication in the absence of IHF. *J Bacteriol*. 171:2066–74.
- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*. 181: 998-1004.
- Boyd EF, Wang FS, Whittam TS, Selander RK. 1996. Molecular genetic relationships of salmonellae. *Appl Environ Microbiol*. 62: 804-808.

- Boyle EC, Bishop JL, Grassl GA, Finlay B.B. 2007. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. J Bacteriol. 189: 1489- 95.
- Brocchi M, Covone MG, Palla E, Galeotti CL. 1999. Integration of minitransposons for expression of the *Escherichia coli elt* genes at a preferred site in *Salmonella typhimurium* identifies a novel putative fimbrial locus. Arch Microbiol. 171: 122-6.
- Bullis, K.L., 1977. The History of Avian Medicine in the U.S. II. Pullorum Disease and Fowl Typhoid. Avian Diseases, 21(3), 422 - 429.
- Cameron AD, Dorman CJ. 2012. A fundamental regulatory mechanism operating through OmpR and DNA topology controls expression of Salmonella pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2. PLoS Genet. 8(3):e1002615
- Cho EH, Nam CE, Alcaraz R, Gardner JF. 1999. Site-Specific Recombination of Bacteriophage P22 Does Not Require Integration Host Factor. J. Bacteriol. 181(14): 4245-9.
- Clavijo, R.I. *et al.*, 2006. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. Applied and environmental microbiology, 72(2), 1055-64.
- Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. Immunol Cell Biol. 85: 112-8.
- Cooper, G.L. *et al.*, 1990. Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis aroA* live oral *Salmonella* vaccine. Microbial pathogenesis, 9(4), 255-65.
- Cotter PA, DiRita VJ. 2000. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. Annu Rev Microbiol. 54: 519-65.
- Covone MG, Brocchi M, Palla E, Dias da Silveira W, Rappuoli R, Galeotti CL. 1998. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. Infect Immun. 66: 224-31.
- Cróinín T, Carroll RK, Kelly A, Dorman CJ. 2006. Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol. 62(3):869-82.
- Cróinín TO e Dorman CJ. 2007. Expression of the Fis protein is sustained in late-exponential- and stationary-phase cultures of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium grown in the absence of aeration. Mol Microbiol 66: 237–251.
- Cox, J., 1995. *Salmonella* Enteritidis: the egg and I. Australian Veterinary Journal, 72(3), 108-115.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 6640-6645.

- Darwin KH, Miller VL. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin Microbiol Rev 12: 405– 28.
- De Groote MA, Testerman T, Xu Y, Stauffer G, Fang FC. 1996. Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium*. Science. 272: 414-7
- Dillon SC, Dorman CJ. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. Nat Ver Microbiol 8(3):185-95
- Dorman CJ. 2009. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. Adv Appl Microbiol. 67: 47-64.
- Dorman CJ, Kane KA. 2009. DNA bridging and antibridging: a role for bacterial nucleoid-associated proteins in regulating the expression of laterally acquired genes. FEMS Microbiol Rev. 33:5 87-92.
- Dorman CJ, Danino V, Cróinín TO, Hinton JCD. 2006 The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol. 59: 1831-1847
- Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi AC, Dias AM, Almeida IA, Melo LC. 2006. *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. Rev Inst Med Trop São Paulo. 48: 179-84.
- Fierer J, Guiney DG. 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. J Clin Invest. 107: 775-80.
- Figuroa-Ochoa IM, Verdugo Rodríguez A. 2005. Molecular mechanism for pathogenicity of *Salmonella* sp. Rev Latinoam Microbiol. 47: 25-42.
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozören N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Núñez G. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. Nat Immunol. 7: 576-82.
- Gantois, I. *et al.*, 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS microbiology reviews, 33(4), 718-38.
- Galán JE, Curtiss R. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 86: 6383-7.
- Groisman, E.A. *et al.*, 1992. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(24), 11.