



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ISABELLA CAROLINA RODRIGUES DOS SANTOS GOES

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE MUTANTES DE *Salmonella* Typhimurium COM
POTENCIAL VACINAL EM *Galleria mellonella***

CAMPINAS
2022

ISABELLA CAROLINA RODRIGUES DOS SANTOS GOES

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE MUTANTES DE *Salmonella Typhimurium* COM
POTENCIAL VACINAL EM *Galleria mellonella***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em
Genética e Biologia Molecular, na Área de
Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

ESTE TEXTO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA ISABELLA CAROLINA
RODRIGUES DOS SANTOS GOES, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO
BROCCHI

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

G553a Goes, Isabella Carolina Rodrigues dos Santos, 1996-
Avaliação da virulência de mutantes de *Salmonella* Typhimurium com potencial vacinal em *Galleria mellonella* / Isabella Carolina Rodrigues dos Santos Goes. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

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

1. Mariposas. 2. *Salmonella* typhimurium. 3. Infecção. 4. Mutação. 5. Atenuação. I. Brocchi, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Assessing *Salmonella* Typhimurium mutants with vaccine potential in *Galleria mellonella*

Palavras-chave em inglês:

Moths

Salmonella typhimurium

Infection

Mutation

Attenuation

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Selma Giorgio

Juliana Pfrimer Falcão

Data de defesa: 13-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9591-7046>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4694811506019295>

Campinas, 13 de Dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Marcelo Brocchi – Membro Titular (Orientador)

Profª Dra. Selma Giorgio – Membro Titular

Profª Dra. Juliana Pfrimer Falcão – Membro Titular (Universidade de São Paulo)

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia/UNICAMP.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu irmão, José Henrique Rodrigues dos Santos, meu coração fora do peito e o maior motivo que me faz lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, por me permitirem chegar até aqui e guiar meu caminho.

A minha mãe Isabele dos Santos, por todo apoio, companheirismo, e por sempre acreditar e me dar forças para realizar os meus sonhos. Ao meu irmão José Henrique Rodrigues dos Santos por ser um garoto inteligente e me fazer enxergar o mundo com outros olhos. As minhas tias, tios, primos, primas e minha avó Darcy por sempre acreditarem em mim e se preocuparem com meu bem-estar mesmo à distância.

Ao meu namorado Vitor Chicarelli Nunes, por seu amor e dedicação, por ser a pessoa com o maior coração e paciência, que sempre me animou e me ajudou ao longo da realização desse trabalho, e a seus pais, que me receberam com amor e carinho, tornando meus dias mais fáceis e felizes.

Aos meus amigos e amigas, que independente da distância, contato e tempo, sempre me apoiaram, me ouviram e me encorajaram antes e durante a realização desse sonho. Em especial ao meu amigo Daniel Moreira Neris que me fez chegar até aqui e me auxilia todos os dias, andando lado a lado comigo nessa jornada.

Ao meu afilhado, Nicolas Kohatsu por alegrar, mesmo tão distante, os meus dias com seu sorriso doce e alma pura.

A professora Dr^a. Valeria Cataneli Pereira que me orientou durante e após a graduação, me fazendo amar cada dia mais a ciência e a microbiologia, sendo sempre um exemplo de dedicação, gentileza e profissionalismo.

Ao meu orientador professor Dr. Marcelo Brocchi pela oportunidade, orientação, e paciência, que divide seus conhecimentos e me inspira todos os dias, como cientista e como pessoa. É um privilégio e um prazer ser orientada por uma pessoa de bom coração.

Aos meus amigos do Laboratório de Doenças Tropicais, que além de me receberem com muito carinho e sempre me ajudarem prontamente, fizeram meus dias mais felizes e risonhos em meio a tempestades, em especial Genesy Perez Jorge, Marco Tulio Pardini Gontijo, Marina Flóro e Silva, Yessica Paola Jaimes Florez, Guilherme Augusto Sanches Roque e Leonardo Geres.

A professora Dra. Francisca Janaina Soares Rocha da Universidade Federal de Pernambuco pelo auxílio e colaboração para a realização das análises histológicas.

A UNICAMP pelo acolhimento durante esses anos e a todos os funcionários que nos auxiliam direta e indiretamente todos os dias e permitem a realização do nosso trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

EPÍGRAFE

"Como cientista, eu sou de fato apenas uma formiga, insuficiente e anônima, mas sou mais forte do que aparento e faço parte de algo que é muito maior que eu."

Lab Girl, Hope Jahren

RESUMO

Galleria mellonella é uma mariposa da ordem Lepidoptera, descrita nos últimos anos como modelo de infecção in vivo na fase larval. *G. mellonella* tem um ciclo de vida curto, tamanho pequeno e desenvolvimento em 28°C – 37°C, o que a torna um bom modelo para infecções bacterianas. Além disso, seu sistema imunológico consiste em respostas contra patógenos, composta por resposta imune celular e resposta imune química. Apesar disso, ainda não é bem demonstrado o paralelismo entre o grau de virulência observados no modelo de *G. mellonella* comparado a outros modelos, indicando que estudos adicionais são necessários para sua completa validação. *Salmonella* Typhimurium é uma bactéria Gram-negativa enteropatogênica responsável por inúmeras mortes e uma grande preocupação para os serviços de saúde pública por sua capacidade de causar desde gastroenterites simples até septicemia. A transmissão ocorre por meio de alimentos e água contaminados e é capaz de infectar galinhas, suínos, bovinos e humanos. Essa preocupação levou a diversos estudos ao longo dos anos, inclusive possibilidade de vacina oral utilizando mutantes atenuados de *Salmonella*. Muitas linhagens de *Salmonella* são construídas, avaliadas e descritas em outros modelos de infecção na literatura. Portanto, este estudo teve como objetivo demonstrar que *G. mellonella* é um modelo eficaz para analisar a atenuação de virulência de linhagens com mutação nos genes $\Delta cya\Delta crp$, $\Delta cya\Delta crp\Delta asd$ e $\Delta aroA$, $\Delta aroA\Delta asd$, que são mutações bem descritas e estão entre os mais utilizados como linhagens mutantes atenuadas de *Salmonella enterica*. Nossos resultados demonstraram que a porcentagem de larvas sobreviventes é superior em larvas inoculadas com linhagens mutantes e as taxas de multiplicação e sobrevivência da bactéria no interior das larvas foi menor para mutantes em comparação com as linhagens selvagens. Além disso, larvas inoculadas com a linhagem selvagem revela uma contagem de hemócitos menor, mielinização maior, e os danos teciduais foram mais acentuados com pontos de mielinização maiores que larvas inoculadas com mutantes $\Delta aroA$ e $\Delta aroA\Delta asd$, reforçando a atenuação da virulência dessas linhagens. Portanto, a utilização desse modelo de infecção é eficaz como triagem inicial para verificar a atenuação da virulência dessas linhagens e futuras linhagens, com potencial vacinal.

Palavras-chaves: *Galleria mellonella*, *Salmonella* Typhimurium; modelo de infecção; mutantes; atenuação; vacinas

ABSTRACT

Galleria mellonella is a wax moth from the order Lepidoptera, described in the last few years as a model for in vivo infection in the larvae stage. *G. mellonella* has a short life cycle, small size, and development at 28°C – 37°C, which makes it a good model for bacterial infections. Furthermore, their immune system consists of responses against pathogens, with cellular and chemical immune responses. However, the parallelism between the degree of virulence observed in the *G. mellonella* model compared to other models has not yet been well demonstrated, indicating that further studies are necessary to validate this model. *Salmonella* Typhimurium is a Gram-negative bacterial enteropathogenic responsible for countless deaths and a major concern for public health services through its ability to cause gastroenteritis and septicemia. The transmission occurs through contaminated food and water, this bacterium is capable of infecting chickens, porcine, cattle, and humans. This concern led to several studies over the years, even the possibility of oral vaccine development using attenuated mutants of *Salmonella*. Thus, different *Salmonella enterica* mutants strains were constructed, evaluated, and described in other infection models in the literature. Therefore, the aim of this study is to test *G. mellonella* as a model for the characterization of known vaccine candidate mutant strains regarding virulence attenuation, validating it as a model for the initial characterization of attenuated strains. The results demonstrate that *G. mellonella* is an effective model for analyzing virulence attenuation in the mutant strains $\Delta cya\Delta crp$, $\Delta cya\Delta crp\Delta asd$, $\Delta aroA$, and $\Delta aroA\Delta asd$, since the percentage of survival was higher in larvae inoculated with mutants strains when compared to the wild type strains. In addition, mutant strains were less able to multiply and survive inside larvae. Furthermore, larvae inoculated with the wild-type strains reveal a lower hemocyte count, higher myelination, and tissue damage when compared to larvae inoculated with $\Delta aroA$ and $\Delta aroA\Delta asd$, reinforcing the attenuation of virulence of these strains. Therefore, the use of this infection model is effective as an initial screening to verify the attenuation of the virulence of *Salmonella* Typhimurium strains with vaccine potential.

Key-words: *Galleria mellonella*; *Salmonella* Typhimurium; infection model; mutant; attenuation; vaccines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Confirmação da integridade do LPS. Controle positivo (1) ATCC 14028; Amostras (2) H683 + pYG 3137; (3). χ 4550 + pYG 3137; (4) χ 3987 + pYG 3137; (5) χ 3985; (6) SL7207 33
- Figura 2:** Confirmação do padrão de LPS. Controle positivo ATCCC 14028. 2. H683 + pYG 3137, 3. H683, 4. Controle negativo *P. aeruginosa* Δ wz. 34
- Figura 3:** Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* ao longo de 96 horas após a inoculação com diferentes linhagens de *Salmonella* Typhimurium mutantes para *cya* e *crp*. Experimento realizado com 10 larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado resultado representativo dos três experimentos realizados. a) Inoculação de UK-1 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva; b) Inoculação de χ 3985 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva; c) Inoculação de χ 3987 + pYG3137 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva 35
- Figura 4:** Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* acompanhadas até 96 horas após a inoculação com mutantes *cya* e *crp*. Experimento realizado com 10 larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado o resultado mais representativo; a) Inoculação de SR11 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva; b) Inoculação de χ 4550 + pYG3137 nas concentrações 10^5 , 10^4 , e 10^3 UFC/larva 36
- Figura 5:** Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* acompanhadas até 96 horas após a inoculação com mutantes *aroA*. Experimento realizado com 10 larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado o resultado mais representativo; a) Inoculação de SL1344 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva; b) Inoculação de H683 + pYG3137 nas concentrações 10^5 , 10^4 , e 10^3 UFC/larva; c) Inoculação de SL7207 nas concentrações 10^5 , 10^4 , e 10^3 UFC/larva..... 37
- Figura 6:** CFU/larva em *G. mellonella* em diferentes tempos. Experimento realizado com cinco larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado a média; a) UK-1 e mutantes derivados desta linhagem inoculados com 10^4 UFC/larva analisado nos tempos 0, 4 e

8 horas após a inoculação; b) SL1344 e mutantes derivados desta linhagem inoculados com 10^4 CFU/larva analisados nos tempos 0, 4 e 8 horas após a inoculação..... 39

Figura 7: Contagem total de hemócitos de *G. mellonella* em diferentes tempos. Experimento realizado com cinco larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado a média; a) SL1344, mutante H683+ pYG3137 e o controle PBS inoculados com 10^4 UFC/larva analisado no tempo 0 horas após a inoculação; b) SL1344, mutante H683+ pYG3137 e o controle PBS inoculados com 10^4 UFC/larva analisado no tempo 4 horas após a inoculação; c) SL1344, mutante H683+ pYG3137 e o controle PBS inoculados com 10^4 UFC/larva analisado no tempo 8 horas após a inoculação; d) SL1344, mutante SL7207 e o controle PBS inoculados com 10^4 UFC/larva analisado no tempo 0 horas após a inoculação; e) SL1344, mutante SL7207 e o controle PBS inoculados com 10^4 UFC/larva analisado no tempo 4 horas após a inoculação; f) SL1344, mutante SL7207 e o controle PBS inoculados com 10^4 UFC/larva analisado no tempo 8 horas após a inoculação. Os asteriscos indicam diferença estatística utilizando o teste One-way ANOVA ($p < 0,05$)..... 41

Figura 8: Análise de fenoloxidase de *G. mellonella* em diferentes tempos. Experimento realizado com cinco larvas por tratamento, em triplicata experimental, sendo demonstrado a média. Os asteriscos indicam diferença estatística utilizando o teste Two-way ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 42

Figura 9: Histopatológico intestinal de *G. mellonella* após inoculação em corte sagital corada com Hematoxilina e Eosina. Controle utilizando PBS em 0, 4 e 8 horas após inoculação (a-c). Linhagem selvagem *Salmonella* Typhimurium SL1344 em 0, 4 e 8 horas após inoculação (d-f). Linhagem mutante *Salmonella* Typhimurium SL7207 em 0,4 e 8 horas após a inoculação (g-i). Linhagem mutante *Salmonella* Typhimurium H683+ pYG 3137 em 0, 4 e 8 horas após a inoculação (j-l). TA: tecido adiposo. L: lúmen. HL: hemolinfa. IM: intestino médio. 44

Figura 10: Corte sagital histopatológico de *G. mellonella* após inoculação corado com Hematoxilina e Eosina demonstrando pontos de mielinização. Controle utilizando PBS em 0, 4 e 8 horas após inoculação (a-c). Linhagem selvagem *Salmonella* Typhimurium SL1344 em 0, 4 e 8 horas após inoculação (d-f). Linhagem mutante *Salmonella* Typhimurium SL7207 em 0,4 e 8 horas após a inoculação (g-i). Linhagem mutante *Salmonella* Typhimurium H683+ pYG3137 em 0, 4 e 8 horas após a inoculação (j-l). Nas setas pretas estão indicados os pontos

de mielinização. Nos círculos estão indicados os hemócitos. TA: tecido adiposo. CL: cutícula.
TM: tecido muscular 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das cepas de <i>S. enterica</i> utilizadas e características genéticas.....	29
Tabela 2: Dose letal média para <i>G. mellonella</i> inoculadas por linhagens de <i>Salmonella</i> Typhimurium via intra-hemocele.	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgNO₃: Nitrato de prata

AMPs: *Antimicrobial peptides*

ATCC: *American Type Culture Collection*

DAP: Ácido diaminopimérico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ATR: *Acid Tolerance Response*

DL₅₀: Dosagem Letal Média

EDTA: Ácido etilenodiaminote

HCl: Ácido Clorídrico

DAP: Ácido Diaminopimérico

IC: Intervalo de Confiança

iNTS: *Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease*

IPS: *Insect Physiological*

LB: Meio Luria Bertani

Log: Logaritmo

LPS: Lipopolissacarídeos

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

MDR: *Multidrug Resistance*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Tampão fosfato-salino

pH: Potencial hidrogeniônico

PO: Fenoloxidase

RNA: Ácido ribonucleico

RND: *Resistance-Nodulation-Cell-Division*

ROS: *Reactive oxygen species*

SCV: Vacúolos conteúdo *Salmonella*

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SPI: Ilha de Patogenicidade

T3SS: *Type three secretion system*

Tris: Tris (hidroximetil)aminometano

UFC: Unidades formadoras de colônia

WT: *Wild-Type*

LISTA DE SÍMBOLOS

g: Força centrífuga relativa

rpm: Rotações por minuto

°C: Graus Celsius

h: Hora: h

μl: Microlitro

mg: Miligrama

mL: Mililitros

min: Minuto:

%: Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	<i>Galleria mellonella</i>	19
1.2	<i>Salmonella enterica</i>	20
1.3	<i>Galleria mellonella</i> e mutantes de <i>Salmonella enterica</i>	22
1.4	<i>Salmonella</i> como vetor vacinal	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivos gerais	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Meios de cultura, cultivo e estocagem	27
3.2	Linhagens bacterianas e plasmídeos	27
3.3	Extração e detecção do lipolissacarídeo em gel de poliacrilamida corado com AgNO ₃	29
3.4	Sobrevivência de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>Salmonella Typhimurium</i>	30
3.5	Determinação da dose letal média	30
3.6	Determinação da UFC/larva de <i>G. mellonella</i>	30
3.7	Determinação da contagem total de hemócitos de <i>G. mellonella</i>	31
3.8	Análise da atividade da fenoloxidase de <i>G. mellonella</i>	31
3.9	Análise histopatológicas de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>Salmonella Typhimurium</i>	32
3.10	Análises estatísticas.....	32
4	RESULTADOS	32
4.1	Integridade do LPS dos mutantes de <i>Salmonella Typhimurium</i>	32
4.2	Mutantes de <i>Salmonella Typhimurium</i> possuem atenuação da virulência em modelo de infecção de <i>G. mellonella</i>	34
4.3	Determinação da dose letal média em <i>G. mellonella</i>	37

4.4	Colonização e persistência de linhagens selvagens de <i>Salmonella</i> Typhimurium ao longo do tempo de inoculação em <i>G. mellonella</i> em comparação as linhagens mutantes	38
4.5	A contagem total de hemócitos diminui em larvas inoculadas com a linhagem selvagem de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	40
4.6	A mielinização aumenta em <i>G. mellonella</i> ao longo da infecção por <i>Salmonella</i> Typhimurium	41
4.7	Análises histopatológicas de <i>G. mellonella</i> apresentam diferenças na preservação do tecido entre linhagens selvagens e mutantes de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	42
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	50
	Anexos	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Galleria mellonella*

Galleria mellonella é uma mariposa da ordem Lepidoptera e da família Pyralidae, com distribuição cosmopolita. Em sua última fase larval é chamada de traça da cera, e considerada uma praga para as colmeias de abelha (Singkum *et al.*, 2019). Entretanto essa fase larval de *G. mellonella* vem sendo utilizada como modelo de infecção *in vivo* de uma série de patógenos (Malmquist *et al.*, 2019). Isso é possível, pois a mariposa tem um ciclo de vida relativamente curto, que se completa em média em 8 semanas e consiste em quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto, e seu desenvolvimento ocorre em temperaturas de 28°C à 37°C, e possui fácil manipulação devido ao seu tamanho pequeno de cerca de 15mm (Malmquist *et al.*, 2019; Singkum *et al.*, 2019). Além disso, o modelo de *G. mellonella*, não demandam necessidade de aprovações em comitês de éticas e financeiramente são muito mais econômicas quando comparada aos outros modelos de animais mamíferos, como por exemplo camundongos, que também são utilizados como modelo de infecção *in vivo* para alguns microrganismos (Cutuli *et al.*, 2019).

Não obstante, a característica que mais se destaca em *G. mellonella* para uso como modelo experimental, é o seu sistema imune, que possui funcionalidade e estrutura semelhantes a imunidade inata em mamíferos, possuindo imunidade celular e imunidade química. A cutícula da larva funciona de forma análoga à pele como uma barreira física, e a resposta celular ocorre quando o patógeno consegue ultrapassar esta defesa e adentrar ao hospedeiro. Esse tipo de defesa é mediada pelos hemócitos, células responsáveis pelo encapsulamento, coagulação e fagocitose dos patógenos, semelhante as funções desempenhadas por células do sistema imune de mamíferos (Rossoni *et al.*, 2019).

Os hemócitos são as células do sistema imune de *G. mellonella*, que funcionam de forma análoga aos neutrófilos, sendo encontrados principalmente na hemolinfa na forma de hemócitos livres, mas podem ser encontrados em órgãos internos como traqueia e aparelho digestório. Existem cerca de seis tipos de células hemocitárias descritas, que se diferem tanto em tamanho e forma quanto em função, sendo elas: os prehemócitos, plasmatócitos, células granulares (ou granulócitos), coagulócitos, esferulócitos e oenocitóides (Bergin *et al.*, 2003). Os plasmatócitos e as células granulares são as mais abundantes e acredita-se que são as maiores responsáveis

pela fagocitose, formação de nódulos e encapsulação. Alguns estudos demonstraram a possibilidade dos oenocitóides também participarem da fagocitose (G. Wu *et al.*, 2016).

Já com relação a resposta química, a defesa ocorre através de peptídeos antimicrobianos (AMPs - *Antimicrobial peptides*), que consistem em uma gama de moléculas, que dependendo do seu mecanismo de ação, possuem atividades específicas contra bactérias, fungos, parasitas e vírus. Dentre essas moléculas peptídicas estão: cecropinas, cobatoxina, moricina, gloverina, galerimicina, e galiomicina, sendo os dois últimos os mais estudados atualmente. (Pereira *et al.*, 2018).

O sistema imune de *G. mellonella* também apresenta interações entre a imunidade química e a imunidade celular. O sistema profenoloxidase é um exemplo desta interação, já que essa proenzima encontra-se nos oenocitóides e é ativada por uma cascata de serino-proteases, além de inibidores de serina que vão controlar e impedir a hiperativação desta enzima. A fenoloxidase ativada irá converter a tirosina em dihidroxifenilalanina (DOPA) e a oxidação de substâncias fenólicas como a quinona, em melanina. O controle para a ativação da fenoloxidase é necessário, uma vez que os produtos intermediários, como os radicais livres, a própria quinona e a DOPA, além de serem tóxicos para o patógeno e auxiliarem a ativação de outras moléculas antimicrobianas, são altamente citotóxicos para as células do próprio hospedeiro. A ativação da fenoloxidase acontece de diversas formas além do reconhecimento de patógenos, e influencia diretamente na melanização da hemolinfa, que normalmente também tem relação com encapsulação e formação de nódulos, duas outras respostas imunes de *G. mellonella* que se assemelham a resposta imune de mamíferos (Wojda, 2017).

As larvas de *G. mellonella* tem se mostrado um eficiente modelo de infecção *in vivo* em ensaios sobre patogenicidade, imunidade e resistência à antimicrobianos, tanto em fungos filamentosos e leveduriformes, protozoários, micobactérias, e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dentre elas *Salmonella enterica* (Meir, M., Grosfeld, T., & Barkan, n.d.; Pereira *et al.*, 2018; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2016).

1.2 *Salmonella enterica*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, geralmente flagelados e predominantemente, de motilidade positiva. As bactérias desse gênero crescem normalmente em temperaturas de 37°C, entretanto alguns isolados apresentam bom crescimento entre 5 °C e 45 °C,. O pH de crescimento entre 4.0- 9.0, sendo 7.0 o pH ideal. Em meio de cultura sólido as

colônias apresentam-se com 2-4 mm de diâmetro, redondas, ligeiramente elevadas e brilhantes (Gast, R. K., & Porter Jr, 2020).

Esse gênero é composto por duas espécies, *Salmonella bongori*, que possui 22 sorotipos, é comumente encontrada em animais de sangue frio, como répteis, anfíbios e peixes, e raramente acomete seres humanos. A outra espécie é *Salmonella enterica*, apresentando maior interesse médico e diversidade, infecta animais de sangue quente como aves, suínos e bovinos, e principalmente seres humanos. Esta última, divide-se em 6 subespécies: I *Salmonella enterica* subsp *enterica*, II *Salmonella enterica* subsp *salamae*, IIIa *Salmonella enterica* subsp *arizonae*, IIIb *Salmonella enterica* subsp *diarizonae*, IV *Salmonella enterica* subsp *houtenae* e VI *Salmonella enterica* subsp *indica* (Lamas *et al.*, 2018; Uno, 2020). Recentemente foi descrito a VII subespécie e sugerido mais três novas subespécies que ainda dependem de validação taxonômicas, mas por hora, foram denominadas como subespécies A, B e C (Alikhan, N. F., Zhou, Z., Sergeant, M. J., & Achtman, 2018). Adicionalmente ainda existem mais de 2.500 sorotipos que são classificados com base nos antígenos O e H, somáticos e flagelares, respectivamente (dos Santos *et al.*, 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) *Salmonella* é atualmente uma das maiores preocupações nos casos de infecções alimentares no mundo, responsável por 180 milhões de casos de doenças diarreicas por ano (Besser, 2018), sendo *S. enterica* subsp *enterica* e seus mais de 1.500 sorotipos os principais agentes. Dentre esses, merecem destaques: *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi, causadoras da febre tifoide e paratifoide respectivamente, e *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium serovares causadores de infecções que variam de gastroenterites a infecções sistêmicas (dos Santos *et al.*, 2019).

Em humanos a infecção por *Salmonella* Enteritidis apresenta-se com sintomatologia de dores abdominais, cefaleia, diarreia, náuseas e vômitos, podendo causar também septicemias. Além das infecções intestinais há relatos de relação da infecção com artrites, endocardites, meningites e infecções urinárias (Lin *et al.*, 2016). As infecções causadas por *Salmonella* Typhimurium vão desde infecções assintomáticas gastroenterites, até septicemias, podendo infectar diversos hospedeiros, como aves, suínos e bovinos, causando infecção em humanos quando consomem a carne desses animais, ou mesmo verduras ou água contaminadas com bactérias (Herrero-Fresno & Olsen, 2018).

Ao serem ingeridas e chegarem até o estômago a bactéria *Salmonella* irá expressar sistemas de tolerância a acidez (ATR - *Acid Tolerance Response*) mantendo o pH intracelular neutro, possibilitando sua sobrevivência e posterior aderência ao epitélio intestinal, para então ocorrer a perda de eritrócitos através da diarreia (dos Santos *et al.*, 2019). Após a adesão, ocorre o

transporte e liberação de proteínas efetoras no citoplasma da célula eucariótica, através do sistema de secreção do tipo três (T3SS1 - *Type III secretion system*) da ilha de patogenicidade 1 (SPI1 - *Salmonella Pathogenicity Island 1*), culminando na ativação de proteínas do citoesqueleto e na invasão celular, sendo que a maior parte da população bacteriana permanece no interior de vacúolos especiais denominados vacúolos contendo *Salmonella* (SCV - *Salmonella-Containing Vacuole*). No SCV a bactéria apresenta a capacidade de sobreviver e se multiplicar, através da ação de proteínas efetoras de outro sistema T3SS codificado por genes da ilha de patogenicidade 2 (SPI2). Esse processo desencadeia uma potente resposta inflamatória intestinal, podendo resultar em colite necrosante com ulcerações (dos Santos *et al.*, 2019; Herrero-Fresno & Olsen, 2018).

O sistema imune inato do hospedeiro é uma barreira contra a infecção por *Salmonella*, controlando a replicação bacteriana, através da liberação de citocinas e quimiocinas que são responsáveis pela atração dos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, até o local da inflamação, entretanto durante a infecção, tais células também abrigam bactérias (Takaya *et al.*, 2020). É necessário então que a resposta imune adaptativa entre em cena, os linfócitos produzem citocinas como IFN- γ e TNF- α , que irão ativar os macrófagos responsáveis pela produção de enzimas lisossomais e de intermediários de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Coelho-castelo *et al.*, 2009). Paralelamente, é necessário que haja a expressão do *Nramp1* (*Natural resistance-associated macrophage protein 1*) nos macrófagos para que estes consigam promover a destruição das células bacterianas. Apesar do sistema imune agir de modo eficaz, a bactéria *Salmonella* consegue adaptar-se muito bem aos ataques do sistema imune e utiliza o processo inflamatório a seu favor, embora linfócitos específicos façam parte da resposta imune protetor que se desenvolve após a infecção (Mittrucker & Kaufmann, 2000).

O uso de antibioticoterapia para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella* só é recomendado em casos severos de infecção, bacteremias, em imunocomprometidos ou bebês. No entanto a resistência a antimicrobianos tem sido uma preocupação a nível global, principalmente os utilizados na primeira linha de tratamento, como a ampicilina, o trimetopim-sulfametoxazol, e o cloranfenicol. Isolados multirresistentes são denominados de MDR (*Multidrug-resistant*), sendo *Salmonella* Typhimurium um dos serovares recorrentes que exhibe este fenótipo (Fàbrega & Vila, 2013).

1.3 *Galleria mellonella* e mutantes de *Salmonella enterica*

O sucesso da utilização de *G. mellonella* como modelo *in vivo* é observado desde os anos 60 (Younghusband & Lee, 1969), e o aumento de artigos sobre o tema nos últimos anos abriu as portas para amplas utilizações desse organismo. Dentre essas utilizações, encontra-se formas de avaliar o potencial de virulência de algumas linhagens mutantes de *S. enterica* com relação ao estabelecimento da infecção, a fim de elucidar funções gênicas da virulência (Bender, J. K., Wille, T., Blank, K., Lange, A., Gerlach, R. G., 2013).

Uma das formas mais diretas de avaliar a virulência, em *G. mellonella*, é estimar a dose letal média (DL₅₀), ou seja, a dosagem necessária para matar 50% dos insetos quando inoculados com o patógeno. A definição de virulência, e a diferença para patogenicidade, ainda causa discussões no meio científico variando de acordo com a área. Contudo, um dos termos que se aplica, é a severidade da doença no hospedeiro causada pelo patógeno, ou seja, a variação em grau da patogenicidade. E a patogenicidade, por sua vez, é definida como a habilidade de um microrganismo de infectar o hospedeiro e causar doença (Thomas & Elkinton, 2004). Ademais, fatores de virulência determinam o grau de virulência de um microrganismos como *Salmonella* Typhimurium, sendo definido como estruturas, estratégias e/ou produtos que vão contribuir para a patogenicidade (dos Santos *et al.*, 2019).

Dentre os fatores de virulência de *Salmonella* Typhimurium encontra-se o lipopolissacarídeo (LPS) uma estrutura pertencente a parede celular que possui relação com a ativação do sistema imune inato e com a resistência à fagocitose e ao sistema complemento. É um fator relacionado a virulência bacteriana bem definido em camundongos e até mesmo em modelos alternativos, como o nematoide *Caenorhabditis elegans*. Bem como, o sistema *phoP-phoQ* que envolve um sistema de regulação de dois componentes fundamentais para a virulência (Groisman, 2001). Bender e colaboradores demonstraram que mutantes de *Salmonella* com deleção de genes regulatórios relacionados a LPS e com deleção do gene *phoQ*, possuem diminuição da capacidade de virulência quando inoculadas em *G. mellonella* (Bender, J. K., Wille, T., Blank, K., Lange, A., Gerlach, R. G., 2013).

Paralelamente, a relação entre resistência múltipla a antimicrobianos (MDR), mediada por bombas de efluxo e a virulência foi recentemente estabelecida. O sistema de transporte de bomba de refluxo, do inglês Resistance-Nodulation-Cell Division (RND), tem como membro principal de sua família uma proteína denominada AcrB (Acriflavina B), que forma um sistema de efluxo tripartido e é o sistema mais abundante e mais bem conservado nas enterobactérias, inclusive em *Salmonella* Typhimurium (Kobylka *et al.*, 2020; Wang-Kan *et al.*, 2017). Além de estar envolvido com o fenótipo MDR a deleção ou inativação do gene *acrB* causa atenuação da virulência de *Salmonella* Typhimurium indicando que este sistema também é importante na

virulência, sendo que a atenuação também foi demonstrada no modelo de *G. mellonella* (Wang-Kan *et al.*, 2017).

Outro fator de virulência que também está relacionado com MDR são proteínas YdfX, que possuem ortólogos em diversas enterobactérias, como *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia. coli*, com funcionamento, estrutura, e ação pouco elucidados (Saha *et al.*, 2016). Lee e colaboradores, descreveram que mutantes de *Salmonella* Typhimurium com deficiências na proteína YdfX quando inoculados em *G. mellonella* possuem virulências diferenciadas de acordo com a conformação da proteína, demonstrando que a forma oligomérica da proteína é mais funcional e necessária para manter a virulência de *Salmonella* Typhimurium do que a forma monomérica (Lee *et al.*, 2019).

As endoribonucleases são enzimas que controlam a degradação e a maturação de algumas moléculas de RNA e tem apresentado papel importante na patogenicidade e virulência de *Salmonella* Typhimurium. Viegas e colaboradores relataram que larvas de *G. mellonella* inoculadas com mutantes de *Salmonella* Typhimurium com deleção de genes codificadores de RNase E e RNase III apresentaram maior taxa de sobrevivência com relação aquelas que foram inoculadas com cepas do tipo selvagem (WT - *Wild-Type*) (Viegas *et al.*, 2013).

Um dos processos que faz parte da linha de defesa da *G. mellonella*, é a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive oxygen species*) gerado através da explosão respiratória iniciado pelo NADP (Cutuli *et al.*, 2019; Singkum *et al.*, 2019). Essa resposta pode ocorrer de duas formas: através da mielinização ou da fagocitose e acúmulo de NADPH oxidase, mas ainda existem dúvidas com relação a efetividade contra infecções desse mecanismo pode ter. Foi demonstrado recentemente que *G. mellonella* produz estresse oxidativo quando linhagens bacterianas mutantes, por exemplo, com genes inativados para catalase e peroxidase, apresentaram virulência diminuída em larvas (Bismuth *et al.*, 2021).

Recentemente investigou-se a eficiência do modelo de *G. mellonella* para o estudo da virulência de cepas de *Salmonella* Typhimurium denominadas ST313, cujas infecções apresentam maior incidência na África subsaariana, sendo caracterizada predominantemente por infecções invasivas (iNTS – *invasive non-typhoidal Salmonella*) em humanos, especialmente em indivíduos imunodeprimidos. Enquanto a ST19, um tipo de cepa comum, mais encontrada no resto do mundo e causa predominantemente gastroenterites em humanos (Lacharme-Lora, L., Owen, S. V., Blundell, R., Canals, R., Wenner, N., Perez-Sepulveda, B., ... & Hinton, 2019). Diferentes modelos de infecção animal foram utilizados na tentativa de mimetizar o quadro infeccioso encontrado em humanos, dentre eles camundongos BALB/c e C57BL/6, bezerros, macacos *Rhesus* e suínos, sendo que apenas o modelo de camundongo e

macacos *Rhesus* reproduziram parcialmente esse quadro (Ramachandran et al., 2017). Adicionalmente, os resultados obtidos com *G. mellonella* não foram efetivos na diferenciação do poder invasivo de ST313, observado em humanos, uma vez que a cepa referente a ST313 apresentou virulência menor que a cepa ST19 (Lacharme-Lora, L., Owen, S. V., Blundell, R., Canals, R., Wenner, N., Perez-Sepulveda, B., ... & Hinton, 2019). Estes dados indicam que há limitações dos modelos de infecção estudados e a necessidade de serem validados.

1.4 *Salmonella* como vetor vacinal

A preocupação com o crescente número de infecções causadas por *Salmonella* levou a diversas investigações e estudos, dentre eles o desenvolvimento de vacinas, principalmente contra a febre tifoide. No final do século XIX começaram a ser desenvolvidas as primeiras vacinas, e já no século XX começaram a ser utilizadas em militares nos Estados Unidos da América e na Inglaterra, mostrando-se eficientes. As vacinas utilizadas eram de células bacterianas inteiras e inativadas, o que normalmente acabava causando reações adversas como febre alta, mal-estar e cefaleia, motivando o desenvolvimento de vacinas que possuíssem maior eficácia, com menos efeitos colaterais, como vacinas atenuadas orais, vacinas de polissacarídeos de administração parenteral e vacinas baseada em polissacarídeos-proteínas conjugadas (Tennant, S. M., & Levine, 2015).

Uma outra estratégia é o desenvolvimento de vacinas de subunidades e um bom exemplo desse tipo de formulação vacinal é o uso de flagelina, subunidade proteica que compõe o flagelo. Desde o final da década de 1960 alguns estudos demonstraram que a flagelina possuía características que induziriam a imunogenicidade e atividades adjuvantes, tornando-a um alvo de estudos para compor formulações vacinais. Recentemente estudos demonstraram que a flagelina possui a capacidade de ativar a imunidade inata e adaptativa induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias sendo utilizada na produção de vacinas (Cui et al., 2018).

As vacinas vivas compostas de linhagens atenuadas e administradas por via oral apresentam algumas vantagens que se sobressaem as demais, como indução da imunidade de células B e T específicas, indução da resposta imunológica de mucosa, e produção mais econômica e ágil. Entretanto a questão de eficiência desse tipo de vacina depende da natureza da cepa atenuada com relação a imunogenicidade do tipo de atenuação, e ausência de reações adversas (Park et al., 2020; Tennant, S. M., & Levine, 2015).

Com os avanços no conhecimento a nível molecular dos mecanismos de patogenicidade e virulência das cepas bacterianas atenuadas, concomitante com os estudos de variabilidade

genética, tornou-se possível a criação de vacinas utilizando diversos tipos de mutações em diversos genes específicos objetivando a criação de vacinas com ação em vários níveis da infecção (Chatfield *et al.*, 1993).

Algumas das construções mais estudadas e caracterizadas em diversos modelos de infecção ao longo dos anos são as mutações no gene *cya* que codifica adenilato ciclase, catalizador da síntese de AMP cíclico a partir do ATP (Adenosina Trifosfato) e o gene *crp* que codifica o receptor do AMP cíclico, ou seja, são genes que codificam elementos que agem em conjunto. Ambos os genes são importantes reguladores globais, embora, demonstraram não ser essenciais para o crescimento permitindo que estes pudessem ser utilizados na construção de linhagens vacinas vivas atenuadas para imunização por via oral (Baud *et al.*, 2004; Covone *et al.*, 1998; Kolb *et al.*, 1993).

Outras linhagens de *Salmonella enterica* com potencial vacinal muito utilizadas são mutantes para o gene *aro*, que possui como produto o ácido corísmico que sintetiza ácido aminobenzoico (*pAB*) e ácido diidroxibenzóico (DHB). Mutantes *aro*, são mutantes auxotróficos, ou seja, requerem metabolitos que não estão presente no hospedeiro, possuindo atenuação da virulência (Hoiseth & Stocker, 1981; Medina *et al.*, 1999; S. Wu *et al.*, 1995).

Também é comum a construção de mutantes duplos, como por exemplo cepas com mutações *cya* e *crp*, ou triplos, como cepas com mutações *cya*, *crp* e nos genes que codificam a síntese de aspartato β -semialdeído desidrogenase (*asd*) (Galán *et al.*, 1990), enzima responsável pela síntese de ácido diaminopimélico (DAP), um aminoácido essencial que compõe o peptidoglicano da parede celular de bactérias Gram-negativas. Assim, sendo um componente essencial para a parede celular, a menos que seja adicionado ao meio de cultura, não existe a possibilidade de crescimento. Outra forma encontrada de fornecer o DAP para a manutenção da parede celular e consequentemente crescimento do microrganismo, é a complementação da deleção através da inserção de plasmídeos contendo o gene *asd* (Clark-Curtiss & Curtiss, 2018).

Adicionalmente a tantos estudos com relação as características de cepas atenuadas de *Salmonella*, algumas descobertas foram feitas, como por exemplo sua capacidade de colonizar tecidos tumorais, impedindo a proliferação de células cancerígenas, funcionando como um tratamento contra tumores (Liang *et al.*, 2019). E também sua capacidade de funcionar como vetor recombinante para a entrega de antígenos, invadindo os tecidos linfoides e estimulando a resposta imune sistêmica, de órgãos, e células (Clark-Curtiss & Curtiss, 2018; Roy Curtiss, 2002).

Sendo assim o amplo conhecimento das diversas possibilidades de genes mutados, gerando mutantes atenuados de *Salmonella* e de suas diversas utilizações, possibilita o desenvolvimento de novas vacinas e terapias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar o padrão de atenuação de mutantes de *Salmonella* Typhimurium já conhecidos no modelo de *G. mellonella*, validando-o como modelo inicial para o estudo da atenuação da virulência de *Salmonella* Typhimurium, fazendo um paralelo com dados já disponíveis de atenuação no modelo murino. A busca de modelos alternativos e mais simples de serem utilizados é hoje fundamental para permitir um avanço mais rápido em pesquisas de virulência e atenuação bacteriana.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com mutantes de *S. enterica*;
- Determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) em diferentes tempos de infecção das larvas de *G. mellonella* por mutantes de *Salmonella* Typhimurium;
- Determinar o número total de hemócitos em diferentes tempos de infecção das larvas de *G. mellonella* por mutantes de *Salmonella* Typhimurium
- Avaliar as mudanças histopatológicas das larvas de *G. mellonella* infectadas por mutantes de *Salmonella* Typhimurium
- Analisar a atividade da enzima fenoloxidase após infecção das larvas de *G. mellonella* por mutantes de *Salmonella* Typhimurium

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura, cultivo e estocagem

Os meios de cultura utilizados foram os meios LB (Luria Bertani) e LB-Ágar como descrito por Sambrook e Russell (2001). A pureza das culturas bacterianas foi verificada por crescimento em meio *MacConkey* e *SS (Salmonella Shigella)* (Oxoid do Brasil Ltda, São Paulo, SP). As linhagens bacterianas foram estocadas a -80 °C em LB com 20% (v/v) de glicerol.

3.2 Linhagens bacterianas e plasmídeos

As linhagens utilizadas estão descritas na Tabela 1. A linhagem de *Salmonella* Typhimurium ATCC (*American Type Culture Collection*) 14028 foi cedida pela FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) e as linhagens SL1344, UK-1, SR11, χ 3985, χ 3987 e χ 4550 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Roy Curtiss III (*Department of Infectious Diseases and Pathology, University of Florida, EUA*). *Salmonella* Typhimurium H683 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. David Michael Hone (*Aeras Global TB Vaccine Foundation, Rockville, EUA*). A linhagem SL7207 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michael Hensel (*Department of Microbiology, Universität Osnabrück, Osnabrück, Alemanha*). A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* (Δ_{wzz}) foi cedida gentilmente pela professora Dr. Regina Lúcia Baldini do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Tabela 1: Descrição das cepas de *S. enterica* utilizadas e características genéticas.

Bactéria	Característica	Referência
<i>S. enterica</i> Typhimurium		
ATCC 14028	Linhagem selvagem de referência	(Jarvik et al., 2010)
SL1344	Linhagem selvagem de referência	(Kröger et al., 2012)
H683	SL1344 Δ aroA Δ asd	(S. Wu et al., 1995)
H683 + pYG3137	SL1344 Δ aroA Δ asd carregando plasmídeo oriundo do plasmídeo pYA3137 modificado para a retirada do promotor do gene <i>asd</i> , <i>ptrc</i> e shine-dalgarno	(Pérez et al., np*)
SL7207	SL1344 Δ aroA	(Medina et al., 1999)
UK-1	Linhagem selvagem de referência	(Luo et al., 2012)
χ 3987 + pYG3137	UK-1 Δ cya Δ crp Δ asd carregando plasmídeo oriundo do plasmídeo pYA3137 modificado para a retirada do promotor do gene <i>asd</i> , <i>ptrc</i> e shine-dalgarno	(Pérez et al., np*)
χ 3985	UK-1 Δ cya Δ crp	(Covone et al., 1998)
SR11	Linhagem selvagem de referência	(Covone et al., 1998)
χ 4550 + pYG3137	SR-11 Δ cya Δ crp Δ asd carregando plasmídeo oriundo do plasmídeo pYA3137 modificado para a retirada do promotor do gene <i>asd</i> , <i>ptrc</i> e shine-dalgarno	(Pérez et al., np*)

*np: não publicado

O plasmídeo pYG3137 foi utilizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa para complementar a produção de ácido diaminopimélico das linhagens Δ asd. Sua construção foi realizada com modificação do plasmídeo pYA3137 (*asd*+, ori pUC) (Zhang et al., 1997) a partir da retirada do promotor do gene *asd*, *P_{trc}* e shine-dalgarno

3.3 Extração e detecção do lipolissacarídeo em gel de poliacrilamida corado com AgNO₃

A extração do LPS foi realizada como descrito anteriormente (Tsai, Chao-Ming; Frasch, 1982), com modificações. As linhagens mutantes foram crescidas em placas de ágar LB. Após 16 horas algumas colônias foram suspendidas em água MiliQ e a densidade óptica ajustadas entre 0.4-0.5 de absorbância no espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer (modelo 22331 Hamburg). O sedimento foi coletado por centrifugação a 9391×g por 2 minutos. O sobrenadante foi então retirado e ao sedimento foi adicionado 50 µL de tampão de amostra que contém TRIS-HCl pH 8.8, 25% de glicerol, 10% de dodecil-sulfato de sódio (SDS) e 0,5% azul de bromofenol. A preparação foi incubada a 100°C por 10 minutos. Prontamente foram adicionados 10 µL de Proteinase K (2,5mg/ mL) e seguido o período de incubação a 60°C por

1 hora sob agitação. Em seguida as amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com 10% de SDS (SDS-PAGE). A corrida foi realizada a 125V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Após a corrida, o gel foi fixado numa solução contendo 40% de etanol e 5% de ácido acético durante a noite e posteriormente transferido para uma solução 40% etanol, 5% de ácido acético e 0,7% de ácido periódico, por 5 minutos. O gel foi então lavado 3 vezes por 10 minutos cada, com água ultrapura, transferido para uma solução de nitrato de prata 20 % por 10 minutos, lavado com água ultrapura como descrito anteriormente, e por fim adicionado numa solução contendo ácido cítrico até a revelação das bandas e lavado novamente com água ultrapura por 10 minutos afim de parar a reação.

3.4 Sobrevivência de *G. mellonella* infectadas por *Salmonella* Typhimurium

O modelo de infecção em *G. mellonella* foi realizado conforme descrito anteriormente (Calarga *et al.*, 2022; Hornsey & Wareham, 2011) com algumas modificações. Foram selecionadas para essas análises três linhagens de referência *Salmonella* Typhimurium e cinco linhagens mutantes isogênicas. As linhagens utilizadas estão descritas na Tabela 1. Para o teste, as linhagens bacterianas foram crescidas até a fase exponencial em meio LB e a cultura submetida a centrifugação (2348×g por cinco minutos) e suspensas em tampão PBS para se alcançar diferentes Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Foram então injetadas as bactérias (10 µL) na última pata falsa (*proleg*) frontal direita, 10 larvas por grupo pesando entre 200 e 350 mg. Como controle, um grupo de cinco larvas foi inoculado com PBS. Após infecção, as larvas foram mantidas a 37°C e avaliadas quanto a mielinização, produção de seda e movimentação a cada 24 horas durante 96 horas. Os dados foram computados e comparados entre linhagens selvagens e mutantes.

3.5 Determinação da dose letal média

Para a determinação da dose letal média, os dados de sobrevivência obtidos com o inóculo de diferentes concentrações bacterianas, de 10^2 até 10^5 , foram computados e o cálculo foi feito através do método “*Moving Average Interpolation*” utilizando o programa MAI (Welkos & O’Brien, 1994).

3.6 Determinação da UFC/larva de *G. mellonella*

Com base em resultados prévios de caracterização da virulência das linhagens no modelo de *G. mellonella*, as larvas foram inoculadas com 10^4 para as linhagens UK-1 e SL1344

e mutantes isogênicos em todos os experimentos seguintes, e o procedimento para determinação do UFC/larva foi realizado como descrito anteriormente (Asai et al., 2019) com modificações. Após a inoculação, as larvas foram desinfetadas externamente com álcool 70%, lavadas em PBS esterilizado, e secas com gaze estéril. Em seguida as larvas foram colocadas em tubo de 1,5 mL contendo PBS estéril, com o auxílio de um micropistilo foi realizada a maceração completa do conteúdo da larva e posteriormente homogeneizada em vórtex. Após esse procedimento, a suspensão foi submetida a centrifugação à 6105×g por 30 segundos.

Em seguida, foi realizado a diluição seriada do sobrenadante em PBS esterilizado e 60 µL de cada diluição foram inoculados em placas de SS-Agar que é seletivo e diferencial para *Salmonella* spp. A cultura foi incubada a 37°C. Os tempos escolhidos para a determinação do CFU foram 0, 4 e 8 horas após a inoculação, sendo feito esse processo em cada um dos tempos contando com cinco larvas em cada tempo. Para o controle, cinco larvas inoculadas com PBS também passaram pelo mesmo procedimento. As colônias crescidas foram então contadas após 16 horas e os dados computados para o cálculo da UFC.

3.7 Determinação da contagem total de hemócitos de *G. mellonella*

Para a coleta da hemolinfa a larva foi colocada em gelo por 2-3 minutos até não apresentar mais movimentos, em seguida foi realizado então um corte no segmento final do abdômen próximo a última pata falsa e retirado 10 µL de hemolinfa, adicionado num tubo com 90 µL de solução de IPS (salina fisiologia para inseto, 150 mM de cloreto de sódio, 5mM de cloreto de potássio, 100mM de TRIS com pH 6.0, 10 mM de EDTA e 30mM de citrato de sódio) sob refrigeração e homogeneizada. Em seguida 10 µL de solução foi colocada em câmara de Neubauer para a determinação da contagem total de hemócitos (THC), como descrito anteriormente, com modificações (DA SILVA, F. P., FERNANDES, K. M., DE FREITAS, L. L., DE SOUZA CASCARDO, R., BERNARDES, R. C., DE OLIVEIRA, L. L., & VANETTI, 2021). O processo foi realizado após 0, 4 e 8 horas da inoculação com cinco larvas para cada tempo. E cinco larvas foram utilizadas como grupo controle inoculado com PBS.

3.8 Análise da atividade da fenoloxidase de *G. mellonella*

Para a análise da atividade da fenoloxidase foi utilizado o protocolo descrito por Andrejko (Andrejko et al., 2014) com modificações. Foram retirados 9 µL de hemolinfa como descrito no item 3.7 e adicionados em 1 µL de IPS, em seguida foram adicionados 2 µL dessa solução em placa de 96 poços contendo 18 µL de Solução A (50mM TRIS-HCl pH 6.8, 1mM

NaCl, 5mM CaCl₂) e as preparações foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente sob abrigo da luz. Após o tempo, foram adicionados 180 µL da solução B (2mM L-DOPA dissolvido em 50 mM de fosfato de sódio pH 6.5). A absorbância foi medida em espectrofotômetro (BIO-TEK, Synergy HT) em 490nm durante 90 minutos com intervalos de 15 minutos entre as leituras para a quantificação da fenoloxidase. O experimento foi realizado entre 0, 4 e 8 horas após a inoculação, com cinco larvas para cada grupo, em cada tempo amostral. Para essa análise foi utilizado um grupo controle com cinco larvas não sendo realizado nenhuma inoculação.

3.9 Análise histopatológicas de *G. mellonella* infectadas com *Salmonella Typhimurium*

As larvas utilizadas para análise histopatológicas foram desinfetadas com álcool 70%, em seguida lavadas com PBS estéril, secas com gaze, e colocadas em gelo por 2-3 minutos, até não apresentarem movimentação. Em seguida as larvas foram adicionadas na solução de paraformaldeído 4% por 24 horas e mantidas em álcool 70%. Posteriormente o material foi parafinizado e realizados cortes, desparafinizados e corados com Hematoxilina e Eosina. O preparo das lâminas foi realizado pelo laboratório Histocell (São Paulo) e as análises das lâminas foram realizadas com a colaboração da professora Francisca Janaina Soares Rocha (Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, UFPE) em microscópio óptico Olympus BX40 e a captura de imagens foi realizada com a câmera Olympus DP25.

3.10 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em três repetições independente. As análises estatísticas foram realizadas através da Análise de Variância (ANOVA), One-way e Two-way como auxílio do programa GraphPad Prism versão 8.0.1 para Windows (GraphPad Prism Software, California, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Integridade do LPS dos mutantes de *Salmonella Typhimurium*

Os mutantes H683 ($\Delta aroA\Delta asd$), $\chi 4550$ ($\Delta cya\Delta crp\Delta asd$), $\chi 3987$ ($\Delta cya\Delta crp\Delta asd$), possuem a mutação no gene *asd* que os torna dependentes de ácido diaminopímelico (DAP) para seu crescimento. Desta forma, para testes *in vivo*, a complementação dessa deficiência é um passo essencial. Importante salientar que mutações no gene *asd* são introduzidas para permitir a estabilização de plasmídeos na construção de linhagens de *S. enterica* carreadoras de antígenos heterólogos, visando a construção de vacinas multifatoriais (Clark-Curtiss & Curtiss, 2018). Previamente modificamos o plasmídeo pYA3137 para expressar níveis menores da enzima *asd*, levando a construção do plasmídeo pYG3137 (*asd*⁺). A importância de avaliar a integridade do LPS está no fato que o processo de eletroporação pode levar a seleção de bactérias mutantes contendo LPS incompleto, que são mais facilmente transformadas, mas exibem maior susceptibilidade ao sistema imune e menor grau de virulência. Assim, para a verificação da integridade do LPS destas linhagens após a eletroporação foi realizada a extração e a análise do perfil de LPS por eletroforese em SDS-PAGE, oxidação com ácido periódico e a coloração com nitrato de prata conforme descrito em 3.3. A Figura 1 demonstra o perfil de LPS das linhagens estudadas através da visualização das bandas após a coloração com prata e oxidação com uma solução de ácido periódico e formaldeído. As bandas correspondem as diferentes ramificações do antígeno O.

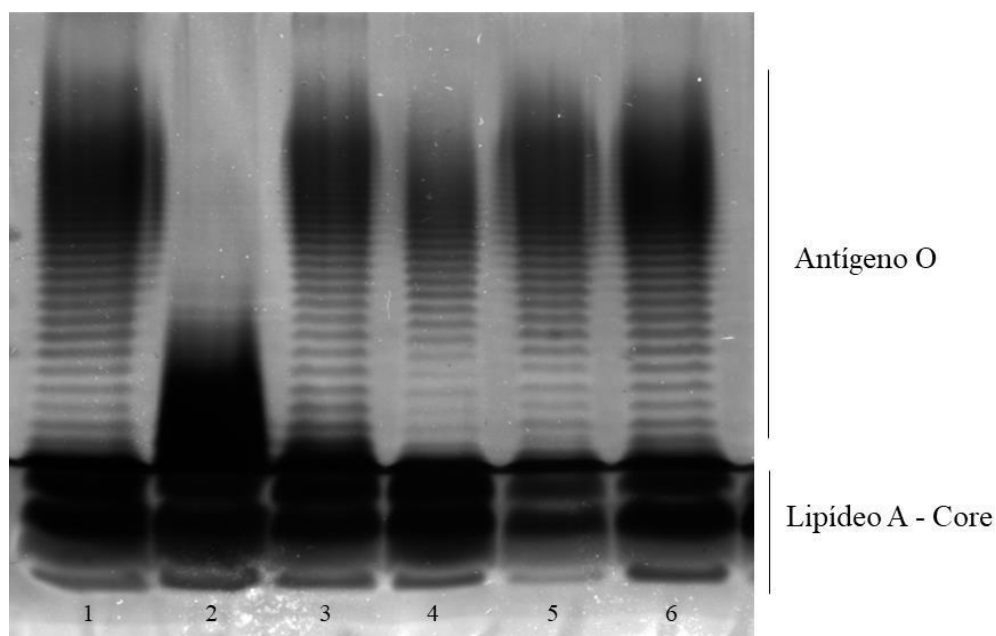


Figura 1: Confirmação da integridade do LPS. Controle positivo (1) ATCC 14028; Amostras (2) H683 + pYG 3137; (3). $\chi 4550$ + pYG 3137; (4) $\chi 3987$ + pYG 3137; (5) $\chi 3985$; (6) SL7207

As linhagens $\chi 4550 + \text{pYG3137}$ e $\chi 3987 + \text{pYG3137}$ apresentaram perfil das ramificações de lipídeo O, similar ao perfil das cepas $\chi 3985$ e SL7207. Já a linhagem H683 + pYG 3137 apresentou um menor número de ramificações de antígeno O (Figura 1). Uma comparação com a linhagem H683 sem o plasmídeo foi necessária para a confirmação desse padrão afim de descartar a possibilidade de uma seleção de mutantes com o LPS incompleto durante o processo de eletroporação para inserção do plasmídeo pYG 3137 nesta linhagem (Figura 2).

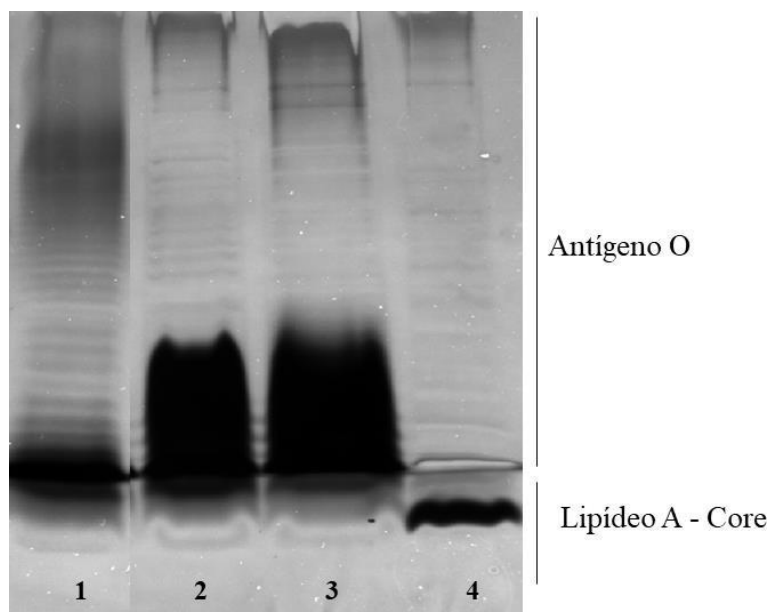


Figura 2: Confirmação do padrão de LPS. Controle positivo ATCCC 14028. 2. H683 + pYG 3137, 3. H683, 4. Controle negativo *P. aeruginosa* $\Delta w z$.

Como observado na figura, tanto a linhagem H683 + pYG 3137 quanto a linhagem H683 sem o plasmídeo, ou seja, sem ter passado pelo processo de eletroporação, apresentam o mesmo padrão de ramificações do antígeno O, demonstrando que provavelmente é uma característica da linhagem apresentada previamente ao processo de eletroporação.

4.2 Mutantes de *Salmonella* Typhimurium possuem atenuação da virulência em modelo de infecção de *G. mellonella*

Após a verificação da integridade do LPS, para avaliar a virulência das linhagens de *Salmonella* Typhimurium, estas foram inoculadas em *G. mellonella* em diferentes concentrações, na quantidade fixa de 10 μL por inóculo, sendo cada grupo composto por 10 larva. A inoculação foi realizada na última pata falsa direita, conforme preconizado na literatura e descrito no material e método. Um grupo controle também foi utilizado, sendo as cinco larvas

deste grupo inoculadas com 10 μ L de PBS. Cada experimento foi realizado em três repetições biológicas.

Com relação a linhagem χ 3985 e χ 3987 + pYG 3137, mutantes isogênicos de UK-1 (WT), identificou-se alto grau de atenuação da virulência com base nos resultados de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* inoculadas com diferentes concentrações bacterianas e observadas diariamente ao longo de 96hrs pós inoculação (Figura 3).

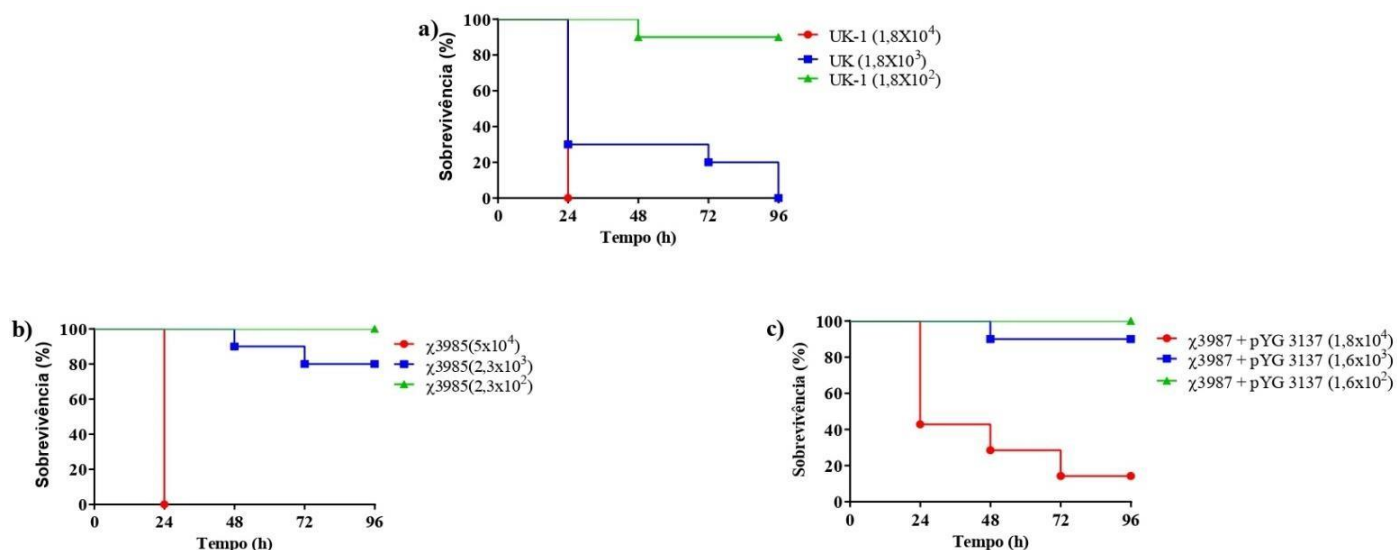


Figura 3: Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* ao longo de 96 horas após a inoculação com diferentes linhagens de *Salmonella Typhimurium* mutantes para *cya* e *crp*. Experimento realizado com 10 larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado resultado representativo dos três experimentos realizados. a) Inoculação de UK-1 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva; b) Inoculação de χ 3985 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva; c) Inoculação de χ 3987 + pYG3137 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva.

Na concentração de 10^4 UFC a linhagem χ 3985 apresentou taxa de letalidade semelhante a UK-1 (WT), enquanto χ 3987 + pYG3137 apresentou atenuação da virulência nessa mesma concentração. Entretanto na concentração 10^3 UFC, ambas as linhagens mutantes apresentaram um perfil de atenuação quando comparadas à linhagem selvagem. A concentração de 10^2 UFC mostrou-se ser uma concentração não letal para os mutantes, tendo sobrevivência de 100% das larvas e de baixa letalidade para a linhagem WT, com sobrevivência de mais de 80%. Os resultados obtidos serviram de base para a realização dos experimentos seguintes com relação as concentrações bacterianas a serem inoculadas.

Para verificar se o *background* genético bacteriano poderia ter alguma influência no uso do modelo de *G. mellonella*, mutantes $\Delta cya\Delta crp\Delta asd$ derivados de linhagem parental diferente foram testados.

A linhagem $\chi 4550 + pYG3137$ mutante isogênico da linhagem SR11 (WT) também apresentou atenuação da virulência em diferentes concentrações quando testado no modelo de *G. mellonella*, como mostra a Figura 4.

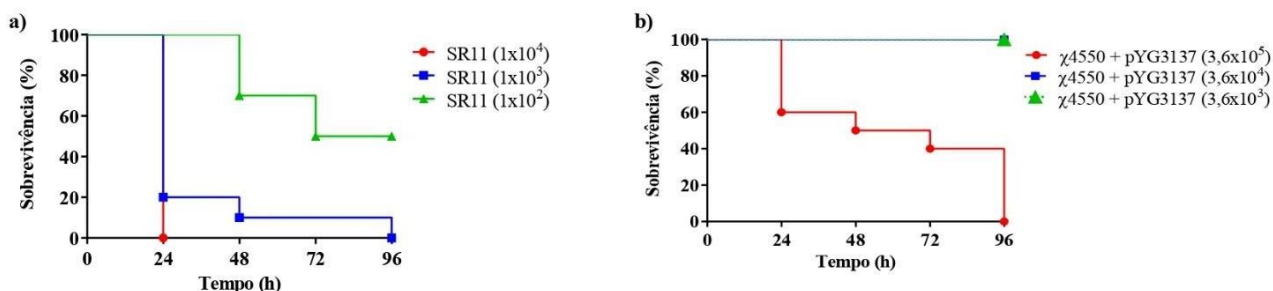


Figura 4: Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* acompanhadas até 96 horas após a inoculação com mutantes *cya* e *crp*. Experimento realizado com 10 larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado o resultado mais representativo; a) Inoculação de SR11 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva; b) Inoculação de $\chi 4550 + pYG3137$ nas concentrações 10^5 , 10^4 , e 10^3 UFC/larva.

Como salientado, as linhagens $\chi 3987 + pYG 3137$ e $\chi 4550 + pYG 3137$ apresentam o mesmo tipo de mutações ($\Delta cya\Delta crp\Delta asd$) porém são derivados de linhagens parentais diferentes, e apresentam padrões de atenuação semelhantes quando testados em *G. mellonella*, indicando que esse modelo é adequado para investigar padrões de atenuações de mutantes nulos para os genes *cya* e *crp*, que são genes regulatórios globais.

Com base nos resultados obtidos anteriormente, para os testes envolvendo mutantes de *S. enterica* $\Delta aroA$, foram testadas concentrações bacterianas que variam de 10^2 a 10^5 UFC. Desta maneira, para a linhagem selvagem SL1344, utilizada por ser a linhagem parental dos mutantes $\Delta aroA$, os resultados indicaram uma curva de mortalidade dose-resposta, com taxas de sobrevivência elevadas em larvas inoculadas com 10^2 UFC/larva, taxas essas que decresceram com o aumento da concentração bacteriana sendo que larvas inoculadas com 10^4 UFC/larva apresentaram 100% de mortalidade após 24 horas. Dessa maneira, a maior dose testada para a linhagem selvagem SL1344 foi de 10^4 CFU/larva (Figura 5).

Com relação linhagens mutantes, SL707 e H683 + pYG3137, foi possível observar um perfil de atenuação da virulência nas diferentes concentrações bacterianas testadas, quando

comparados a linhagem selvagem (Figura 5). Para as linhagens mutantes, uma curva dose-resposta também foi observada, sendo que o perfil de atenuação parece ser mais acentuado para a linhagem H683 + pYG 3137. Contudo, para ambas as linhagens contendo mutação em enzima pertencente a via de síntese dos aminoácidos aromáticos, a concentração de 10^3 UFC/larva, esteve associada a 100% de sobrevivência, enquanto esta mesma concentração levou a morte de grande maioria das larvas inoculadas com a linhagem selvagem SL1344.

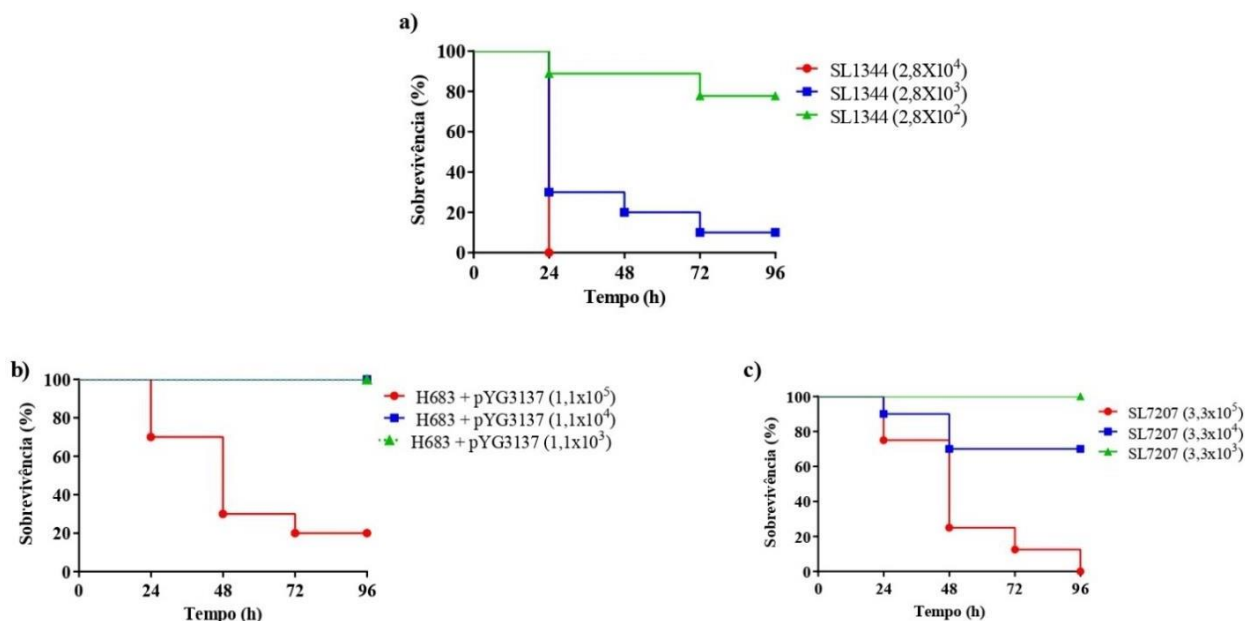


Figura 5: Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* acompanhadas até 96 horas após a inoculação com mutantes *aroA*. Experimento realizado com 10 larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado o resultado mais representativo; a) Inoculação de SL1344 nas concentrações 10^4 , 10^3 , e 10^2 UFC/larva; b) Inoculação de H683 + pYG3137 nas concentrações 10^5 , 10^4 , e 10^3 UFC/larva; c) Inoculação de SL7207 nas concentrações 10^5 , 10^4 , e 10^3 UFC/larva

4.3 Determinação da dose letal média em *G. mellonella*

Baseado nos dados de sobrevivência de *G. mellonella* após a inoculação de diferentes concentrações de *Salmonella* Typhimurium, foi realizado o cálculo da DL_{50} , ou seja, a concentração de células bacterianas que irão causar a morte de 50% das larvas, e o IC (Intervalo de Confiança), nesse caso a via de inoculação é intra-hemocele. Os cálculos foram realizados com o programa MAI, com 10 larvas por grupo de tratamento e utilizando triplicatas biológicas.

Os dados na tabela abaixo demonstram o perfil de atenuação da virulência dos mutantes de *Salmonella* Typhimurium, visto que os valores da DL_{50} para as linhagens selvagens foram um ou dois logs menores que os observados para as linhagens mutantes. A DL_{50} de UK-1 calculada, foi $4,41 \times 10^2$ enquanto para os mutantes $\chi 3985$ e $\chi 3987 + pYG3137$, foi de $4,59 \times 10^3$ e $5,69 \times 10^3$, respectivamente. Para a linhagem selvagem SL1344 a DL_{50} foi de $6,64 \times 10^2$, já para o mutante SL7207 foi de $2,08 \times 10^4$ e para H683 + pYG3137 foi $6,19 \times 10^4$. Enquanto para SR11, a DL_{50} foi de $3,6 \times 10^1$, demonstrando ser o mais virulento entre as linhagens selvagens, o mutante $\chi 4550 + pYG3137$ exibiu a menor DL_{50} entre as linhagens testadas.

Tabela 2: Dose letal média para *G. mellonella* inoculadas por linhagens de *Salmonella* Typhimurium via intra-hemocele.

Linhagem	DL_{50}	IC
UK-1	$4,41 \times 10^2$	$2,53 \times 10^2$ a $7,69 \times 10^2$
$\chi 3985$	$4,59 \times 10^3$	$2,51 \times 10^3$ a $8,38 \times 10^3$
$\chi 3987 + pYG3137$	$5,69 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$ a $1,5 \times 10^4$
SL1344	$7,38 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$ a $1,84 \times 10^3$
SL7207	$2,08 \times 10^4$	$1,05 \times 10^4$ a $4,15 \times 10^4$
H683 + pYG3137	$6,19 \times 10^4$	$2,42 \times 10^4$ a $1,58 \times 10^5$
SR11	$3,16 \times 10^1$	$1,56 \times 10^0$ a $6,41 \times 10^2$
$\chi 4550 + pYG3137$	$1,30 \times 10^5$	**

**Dados imprecisos, sem valores intermediários

4.4 Colonização e persistência de linhagens selvagens de *Salmonella* Typhimurium ao longo do tempo de inoculação em *G. mellonella* em comparação as linhagens mutantes

Para a determinação de UFC/larva foi definido que a concentração inicial inoculada nas larvas seria 10^4 bactérias, tendo como bases os dados de sobrevivência e DL_{50} . Os experimentos foram realizados em triplicata com 10 μ L de bactéria inoculadas na última pata falsa, em cinco larvas para cada grupo em cada um dos tempos. O grupo controle, também composto por cinco larvas foi inoculado com 10 μ L de PBS nos mesmos tempos experimentais dos grupos testes. Não houve crescimento bacteriano em nenhum dos controles em nenhuma das triplicatas.

É possível observar que a linhagem UK-1, apresenta alta capacidade de crescimento no interior da larva durante todo o tempo de experimento, enquanto a linhagem $\chi 3985$ apesar de

também apresentar um aumento de crescimento, este ocorre em menores taxas quando comparado ao observado para UK-1, tanto no tempo 4 horas quanto no tempo 8 horas pós-inóculo. Além disso a taxa de crescimento bacteriano medida em UFC foi menor entre 4 e 8 horas se comparada ainda ao período anterior. Esses dados indicam menor capacidade de crescimento da linhagem mutante, quando comparada a linhagem selvagem. Com relação a linhagem $\chi 3987 + pYG3137$ foi possível observar que 4 horas após a inoculação houve um aumento da UFC bacteriana, semelhante a linhagem $\chi 3985$, entretanto 8 horas após a inoculação observa-se a diminuição no número de UFC em relações aos valores observados após 4 horas. Coletivamente, esses dados corroboram com os experimentos anteriores (taxa de sobrevivência e DL_{50}) indicando o fenótipo de atenuação dos mutantes $\Delta cya \Delta crp$. (Figura 6).

A linhagem SL1344 apresentou um alto e constante crescimento no interior da larva ao longo do tempo, enquanto o mutante SL7207 apresentou aumento após 4 horas de inoculação, mas decréscimo entre 4 e 8 horas, resultados similares foram observados para a linhagem H683+pYG3137, corroborando com os dados de sobrevivência e DL_{50} indicando o perfil de atenuação da virulência de mutantes $\Delta aroA$,

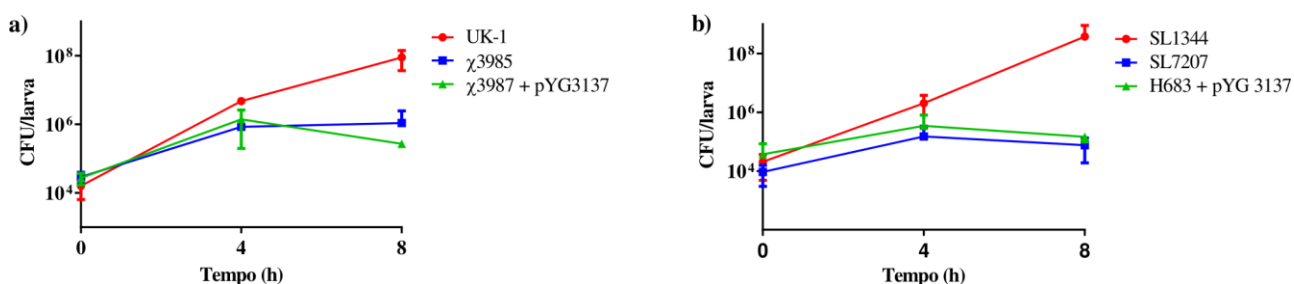


Figura 6: CFU/larva em *G. mellonella* em diferentes tempos. Experimento realizado com cinco larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado a média; a) UK-1 e mutantes derivados desta linhagem inoculados com 10^4 UFC/larva analisado nos tempos 0, 4 e 8 horas após a inoculação; b) SL1344 e mutantes derivados desta linhagem inoculados com 10^4 CFU/larva analisados nos tempos 0, 4 e 8 horas após a inoculação.

A linhagem mutante $\chi 4550 + pYG 3137$ não apresentou o crescimento adequado para a contagem de colônias quando inoculado nas placas de ágar SS após a diluição seriada do macerado de *G. mellonella* mesmo apresentando crescimento no preparo do inóculo bacteriano. Esse mutante possui as mesmas mutações que as linhagens $\chi 3985$, e $\chi 3987 + pYG 3137$, nos

genes *cya*, *crp*, sendo que este último também apresenta a deleção no gene *asd*, dessa forma não prosseguimos com os experimentos de UFC de SR11 e χ 4550 + pYG 3137.

Diante dos dados obtidos, as linhagens mutantes $\Delta cya\Delta crp$ e $\Delta aroA$ apresentaram perfil de atenuação no modelo de *G. mellonella*, mas optamos por dar seguimento aos demais experimentos focando nos mutantes $\Delta aroA$.

4.5 A contagem total de hemócitos diminui em larvas inoculadas com a linhagem selvagem de *Salmonella Typhimurium*

Com relação a contagem total de hemócitos, utilizamos o inóculo bacteriano inicial de 10^4 UFC/larva para cada uma das linhagens, sendo inoculado 10 μ L por larva como descrito anteriormente. O grupo controle foi inoculado com 10 μ L de PBS. Foram utilizadas cinco larvas por tratamento para cada tempo. Para a contagem, foram retirados 10 μ L de hemolinfa e ressuspensas em 90 μ L de IPS, sendo utilizados 10 μ L da solução para a contagem de hemócitos em câmara de Neubauer (Kasvi) com o auxílio de microscópio óptico Olympus BX40 ajustado com a objetiva de 40x (aumento de 400x).

Como descrito anteriormente os hemócitos são células responsáveis pela resposta imune de *G. mellonella*. Assim, podemos observar que no grupo controle inoculado com tampão PBS, o número de hemócitos se mantém constante ao longo do tempo estudado, assim como os grupos inoculados com as linhagens H683+ pYG3137 e SL7207, apesar de apresentarem uma contagem de hemócitos significativamente menor se comparado ao grupo controle PBS, considerando os tempos de 4 e 8 horas pós inoculação, para H683+ pYG3137, e 4 horas para a SL7207. Por outro lado, o grupo de larvas inoculados com a linhagem selvagem SL1344 apresenta diminuição no número de hemócitos após o tempo 0 horas pós infecção. Após 4 horas, existe uma diferença significativa entre os grupos inoculados com SL1344, o grupo controle PBS e linhagens H683+ pYG3137 e SL7707. Já no tempo de 8 horas os valores de hemócitos observados no grupo correspondente à linhagem selvagem também apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos H683+pYG3137 e controle PBS, mas não apresenta diferença significativa comparado a linhagem SL7207 (Figura 7).

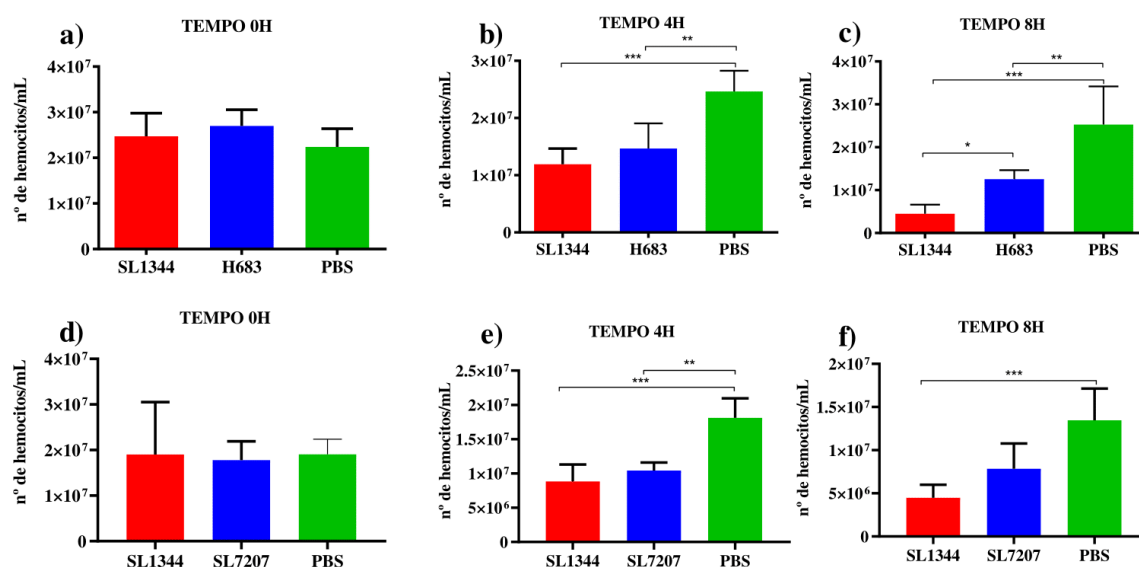


Figura 7: Contagem total de hemócitos de *G. mellonella* em diferentes tempos. Experimento realizado com cinco larvas por tratamento em triplicata experimental sendo demonstrado a média; a) SL1344, mutante H683+ pYG3137 e o controle PBS inoculados com 10⁴ UFC/larva analisado no tempo 0 horas após a inoculação; b) SL1344, mutante H683+ pYG3137 e o controle PBS inoculados com 10⁴ UFC/larva analisado no tempo 4 horas após a inoculação; c) SL1344, mutante H683+ pYG3137 e o controle PBS inoculados com 10⁴ UFC/larva analisado no tempo 8 horas após a inoculação; d) SL1344, mutante SL7207 e o controle PBS inoculados com 10⁴ UFC/larva analisado no tempo 0 horas após a inoculação; e) SL1344, mutante SL7207 e o controle PBS inoculados com 10⁴ UFC/larva analisado no tempo 4 horas após a inoculação; f) SL1344, mutante SL7207 e o controle PBS inoculados com 10⁴ UFC/larva analisado no tempo 8 horas após a inoculação. Os asteriscos indicam diferença estatística utilizando o teste One-way ANOVA (p<0,05).

4.6 A mielinização aumenta em *G. mellonella* ao longo da infecção por *Salmonella* Typhimurium

A enzima fenoloxidase é precursora da mielinização, uma das primeiras respostas imunes de *G. mellonella*, e para observarmos essa ação após tratamento com *Salmonella* Typhimurium, 10µL de suspensões bacterianas contendo 10⁴ CFU/larva foram inoculadas na última pata falsa em grupos compostos por cinco larvas para cada linhagem. Para este experimento o grupo controle escolhido não passou por nenhum tipo de inoculação, denominado como *naive*.

Podemos observar que no tempo 0 após a inoculação, a mielinização é semelhante para as linhagens SL1344, SL7207 e H683 + pYG3137, e controle *naive*. Já no tempo 4 horas pós infecção, as larvas do grupo inoculadas com SL1344 apresentaram aumento da mielinização, enquanto nos grupos inoculados com as demais linhagens, os valores foram comparáveis aos observados no tempo 0 horas. O aumento da mielinização no grupo tratado com a linhagem SL1344 ficou ainda mais evidente 8 horas após a infecção, sendo a diferença estatística significativa quando comparado aos valores observados com as linhagens mutantes SL7207 e H683 + pYG3137, assim como para o controle *naive*. Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens mutantes e o grupo controle *naive*. Demonstrando assim a relação entre a atenuação da virulência e a capacidade de diminuir o processo de mielinização em *G. mellonella*.

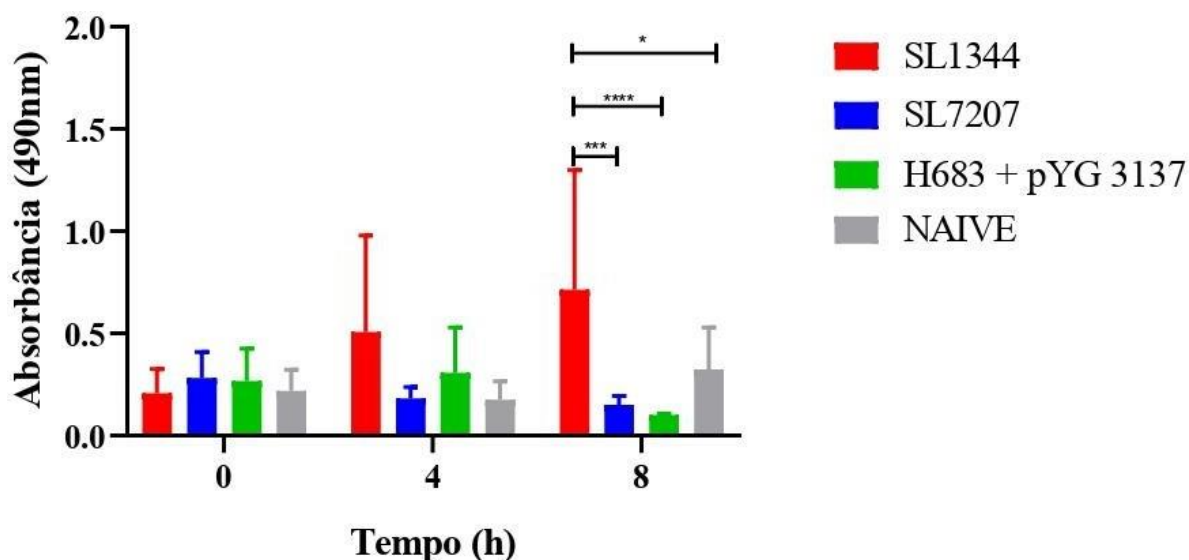


Figura 8: Análise de fenoloxidase de *G. mellonella* em diferentes tempos. Experimento realizado com cinco larvas por tratamento, em triplicata experimental, sendo demonstrado a média. Os asteriscos indicam diferença estatística utilizando o teste Two-way ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.7 Análises histopatológicas de *G. mellonella* apresentam diferenças na preservação do tecido entre linhagens selvagens e mutantes de *Salmonella* Typhimurium

Para observar alterações histopatológicas nos tecidos de *G. mellonella* após a inoculação por *Salmonella* Typhimurium utilizamos os mesmos procedimentos de inóculo descritos

anteriormente com 10^4 UFC/larva. Para o grupo controle, utilizou-se 10 μ L de PBS, cada um dos grupos foi composto por cinco larvas. Para esse experimento foram utilizados os tempos 0, 4 e 8 horas pós inoculação. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica.

As análises histopatológicas indicaram que o tecido intestinal estava bem preservado, e com microvilosidades bem definidas no tempo 0 após a inoculação (Figura 10a, d, g, j) em todos os grupos analisados. No tempo 4 horas após a inoculação observa-se que o tecido e as microvilosidades das larvas pertencentes ao grupo inoculado com a linhagem SL1344 (Figura 10e) estão parcialmente destruídos, diferentemente do controle PBS, e dos grupos inoculados com SL7207 e H683 + pYG3137 (Figura 10b, h, k, respectivamente) que apresentaram os tecidos e as microvilosidades bem preservadas. No tempo de 8 horas pós-inoculação, também é possível observar que os tecidos do grupo controle PBS e dos grupos inoculados com as linhagens mutantes apresentaram-se bem preservados (Figura 10c, i, l, respectivamente), enquanto para a linhagem selvagem o tecido encontra-se destruído e as microvilosidades indefinidas (Figura 10f).

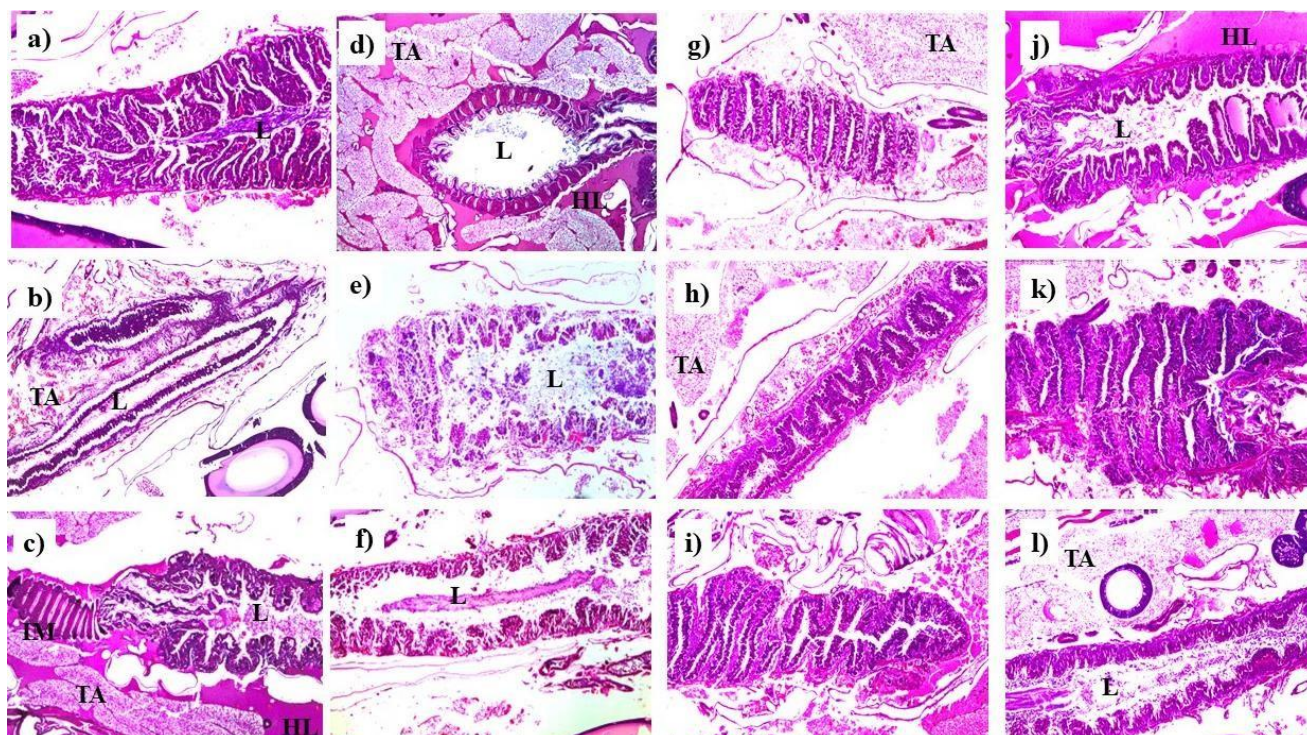


Figura 9: Histopatológico intestinal de *G. mellonella* após inoculação em corte sagital corada com Hematoxilina e Eosina. Controle utilizando PBS em 0, 4 e 8 horas após inoculação (a-c). Linhagem selvagem *Salmonella* Typhimurium SL1344 em 0, 4 e 8 horas após inoculação (d-f). Linhagem mutante *Salmonella* Typhimurium SL7207 em 0,4 e 8 horas após a inoculação (g-i). Linhagem mutante *Salmonella* Typhimurium H683+ pYG 3137 em 0, 4 e 8 horas após a inoculação (j-l). TA: tecido adiposo. L: lúmen. HL: hemolinfa. IM: intestino médio.

Em relação a mielinização podemos observar pequenos pontos indicados por setas no tempo 0 após a inoculação no controle PBS (Figura 11a), na linhagem SL1344 (Figura 11d), e nas linhagens mutantes SL7207 (Figura 11g) e H683 + pYG3137 (Figura 11j), possivelmente causado como resposta ao estresse da inoculação e aclimatização à 37°C. Entretanto no tempo 4 horas após a inoculação é possível observar que a linhagem SL1344 (Figura 11e) possuía ponto de mielinização visivelmente maior do que no tempo 0, comparado com o controle PBS (Figura 11b) e com as linhagens mutantes (Figura 11h, k) SL7207 e H683+ pYG3137 respectivamente no mesmo período. Já no tempo 8 horas após a inoculação podemos observar que a mielinização prolongou-se nos tecidos mostrando mielinização mais intensa e extensa quando comparado no mesmo tempo com o controle PBS (Figura 11c) e com as linhagens SL7207 (Figura 11i) e H683 + pYG3137 (Figura 11 l). Essas características de destruição e mielinização do tecido de *G. mellonella* na linhagem SL1344 e não nas linhagens SL7207 e

H683 + pYG3137 demonstram a atenuação da virulência destas linhagens neste modelo de infecção.

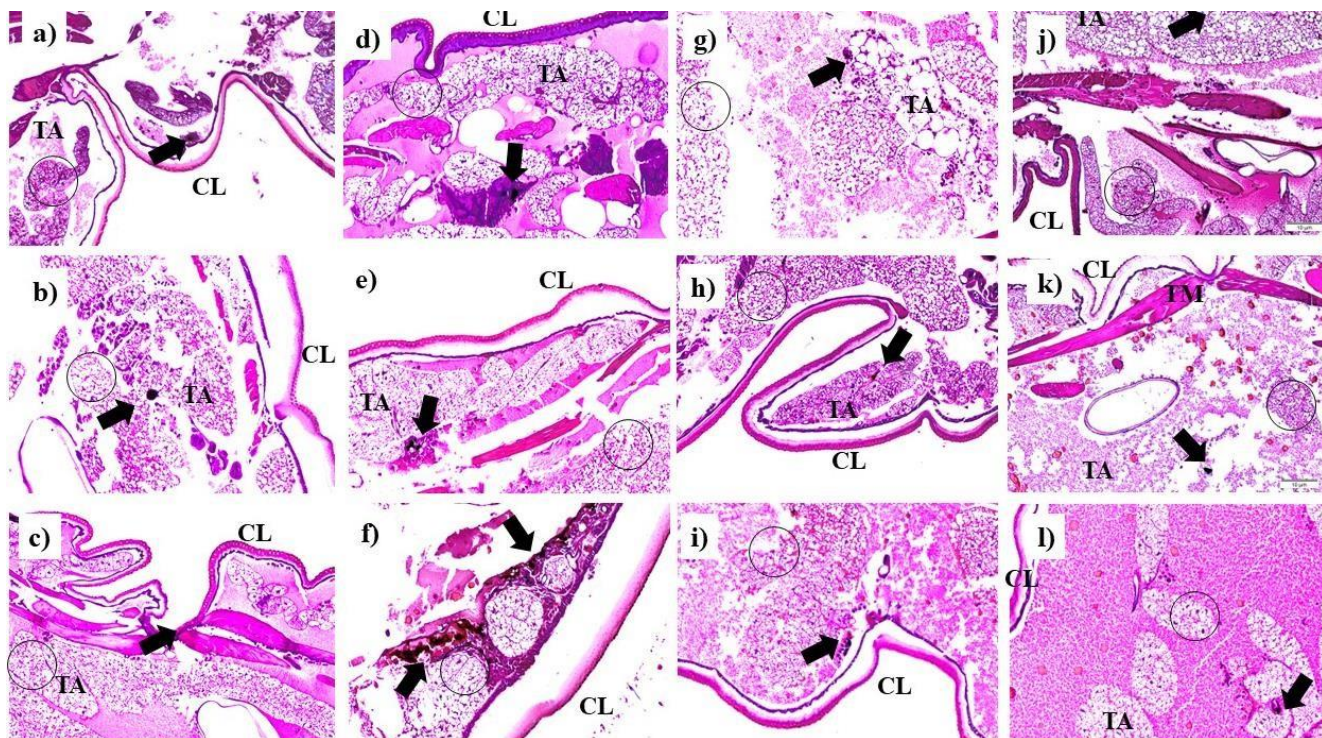


Figura 10: Corte sagital histopatológico de *G. mellonella* após inoculação corado com Hematoxilina e Eosina demonstrando pontos de mielinização. Controle utilizando PBS em 0, 4 e 8 horas após inoculação (a-c). Linhagem selvagem *Salmonella* Typhimurium SL1344 em 0, 4 e 8 horas após inoculação (d-f). Linhagem mutante *Salmonella* Typhimurium SL7207 em 0,4 e 8 horas após a inoculação (g-i). Linhagem mutante *Salmonella* Typhimurium H683+ pYG3137 em 0, 4 e 8 horas após a inoculação (j-l). Nas setas pretas estão indicados os pontos de mielinização. Nos círculos estão indicados os hemócitos. TA: tecido adiposo. CL: cutícula. TM: tecido muscular.

5 DISCUSSÃO

As infecções causadas por bactérias do gênero *Salmonella*, são atualmente uma das grandes preocupações a nível global. Dentre as iNTs, o destaque para *Salmonella* Typhimurium, relacionada diretamente com alta taxa de mortalidade entre os patógenos causadores de doenças alimentares (Herrero-Fresno & Olsen, 2018), inclusive sendo a principal causa de morte em crianças menores de cinco anos na África subsariana (Baliban *et al.*, 2020). Mesmo sendo na maioria dos casos uma infecção branda, e quando severa, tratável com

antibioticoterapia, os casos de resistência por *Salmonella* Typhimurium a antibióticos têm aumentado, causando preocupações (L. J. Wu *et al.*, 2021). Além disso economicamente, nos EUA, o impacto causado por salmonelose é extremamente alto, levando ao desenvolvimento de vacinas (Strugnell *et al.*, 2014).

Atualmente há vacinas utilizadas para *Salmonella* Typhi, como a injetável utilizando polissacarídeo Vi sendo a resposta protetora mediada por anticorpos, e a linhagem Ty21a, linhagem vacinal atenuada administrada por via oral, que embora induza resposta imune protetora, é geralmente, de curta duração (Martin, 2012). Já para *Salmonella* Typhimurium possíveis vacinas continuam sendo pesquisadas e desenvolvidas, como vacinas utilizando subunidades do antígeno O, proteínas de membrana, flagelina e vacinas vivas atenuadas. Quando falamos de vacinas vivas atenuadas, falamos da utilização de uma bactéria com mutações que embora atenuem a virulência, seja capaz de desencadear uma resposta imune protetora (Martin, 2012). Em modelo animal, a virulência dos mutantes e a eficiência da atenuação vem sendo testada de diversas formas (Strugnell *et al.*, 2014). Sendo assim, a verificação da virulência de um mutante que possui potencial vacinal é essencial, e o modelo de *G. mellonella*, foi introduzido e vem sendo amplamente testado como um possível modelo inicial para avaliação de virulência de diversos microrganismos (Asai *et al.*, 2022; Prakoso *et al.*, 2022; Tian, 2022).

A busca e validação de modelos alternativos de infecção é um movimento mundial que tem sido encorajado nos últimos anos devido a questões éticas envolvidas no uso de animais vertebrados e no alto custo desses modelos de infecção. Existem atualmente inúmeros dados científicos que vêm sendo discutido, a respeito dos mais diversos modelos de infecção alternativo, que vão desde pequenos vertebrados, a insetos e nematoides. Nenhum modelo de infecção é perfeito, apresentando cada um suas limitações, tornando a junção dos dados que cada um deles fornece uma boa alternativa, como é o caso de *G. mellonella* (López Hernández *et al.*, 2015).

A mutação Δasd , que consiste na deleção de um gene essencial da síntese de ácido diaminopimelico componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, normalmente complementado com plasmídeo asd^+ , é uma das mutações mais utilizadas. Como por exemplo a linhagem $\chi 3987$, que possui as mutações $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$, as mesmas mutações da linhagem $\chi 3985$, sendo que está linhagem não possui a mutação Δasd . As mutações $\Delta cya \Delta crp$ consistem na deleção de genes da adenilato ciclase e da proteína do receptor de AMP cíclico, respectivamente.

A linhagem $\chi 3985$ demonstrou atenuação importante em diversos modelos de infecção na qual foi testado, tanto modelos murinos quanto aves (Roy Curtiss & Hassan, 1996), sendo uma linhagem promissora devido a estabilidade de suas mutações. Esses resultados replicam-se quando falamos do modelo de *G. mellonella*, já que nossos dados demonstraram virulência diminuída tanto nos ensaios de sobrevivência quanto nos ensaios de colonização e persistência no interior da larva, onde pudemos observar que houve uma queda na colonização durante os tempos avaliados. Como dito anteriormente, a linhagem $\chi 3987$ possui uma mutação a mais que a linhagem $\chi 3985$, a mutação Δasd complementada com um plasmídeo *asd+*, tornando naturalmente esta linhagem ainda mais atenuada, como descrito em modelos murinos (R. Curtiss et al., 1990) corroborando com os dados encontrados no modelo de infecção de *G. mellonella*, uma vez que as duas linhagens mutantes apresentaram atenuação com relação a linhagem selvagem UK-1 e a linhagem acrescida da mutação Δasd apresentou uma taxa de mortalidade mais baixa e também uma colonização e persistência menores.

Com relação a linhagem $\chi 4550$ que possui as mesmas mutações que a linhagem $\chi 3987$, podemos observar também uma atenuação da virulência no modelo proposto neste trabalho, de forma semelhante ao que foi observado nos modelos murinos (R. Curtiss & Kelly, 1987; Karem et al., 1995). Além disso essa linhagem apresentou uma DL_{50} menor entre as linhagens com as mesmas mutações, demonstrando ser a mais atenuada dentre as linhagens.

Estes dados sugerem que o modelo de *G. mellonella* apresenta, para as mutações Δcya , Δcrp e $\Delta cya\Delta crp\Delta asd$, uma alternativa de modelo inicial para avaliação da atenuação da virulência destas linhagens quando comparada com as linhagens selvagens isogênicas, semelhantes ao encontrado na literatura para outros modelos de infecção que utilizam mutações como essas (Curtiss III, R., Goldschmidt, R. M., Fletchall, N. B., & Kelly, 1988). Contudo, as linhagens selvagens utilizadas, UK-11 e SR11 apresentaram uma diferença com relação a DL_{50} encontrada em modelos murinos, visto que a linhagem SR11 em modelo de *G. mellonella* apresentou uma DL_{50} um log menor do que a DL_{50} da linhagem UK-1, enquanto na literatura a DL_{50} da UK-1 é menor para camundongos, demonstrando que possivelmente para esse modelo de infecção, a SR11 é mais virulenta (Curtiss III, 1990).

Assim como as linhagens mencionadas acima, as mutações $\Delta aroA$ são relatadas com sucesso na atenuação da virulência de linhagens com potencial vacinal, em outros modelos de infecção como em murinos. Essa mutação consiste na deleção de genes relacionados a síntese de compostos com anéis aromáticos (Hoiseth & Stocker, 1981) e algumas linhagens podem

conter também a mutação Δasd , como é o caso da linhagem H683+ pYG3137, que é derivada geneticamente da linhagem SL7207 que possui apenas a mutação *aroA*, e deriva geneticamente da linhagem selvagem SL1344 (Johnson, Síle A.; Ormsby, Michael J.; Wall, 2017).

No modelo de infecção alternativo, *G. mellonella*, as linhagens com mutações $\Delta aroA$ e $\Delta aroA\Delta asd$ demonstraram um perfil de atenuação menor quando comparadas a linhagem SL1344, além das taxas de sobrevivência das larvas terem sido maiores para as linhagens mutantes, o crescimento bacteriano no interior da larva, foi menor, demonstrando o fenótipo de atenuação.

Adicionalmente, foram realizados experimentos, como a contagem total de hemócitos, com o objetivo de caracterizar melhor o modelo de *G. mellonella* com relação as linhagens $\Delta aroA$. Sendo as células hemocitárias uma parte importante da imunidade das larvas, responsáveis pela encapsulação, fagocitose, e formação de nódulos, é descrito na literatura uma relação entre maior virulência do microrganismo e uma queda na densidade total de hemócitos (Arteaga Blanco *et al.*, 2017; Bergin *et al.*, 2003; Thomaz *et al.*, 2020), inclusive em *Salmonella* Enteritidis (da Silva, F. P., Fernandes, K. M., de Freitas, L. L., de Souza Cascardo, R., Bernardes, R. C., de Oliveira, L. L., ... & Vanetti, 2021). Estes dados corroboram com o encontrado neste trabalho, onde foi possível observar que as larvas inoculadas com a linhagem de referência SL1344 apresentaram uma queda na contagem total de hemócitos ao longo da infecção comparada as linhagens mutantes SL7207 e H683 + pYG3137, enquanto as larvas controles inoculadas com PBS apresentaram alto e constante padrão na contagem total de hemócitos ao longo do tempo. Possivelmente a queda do número de hemócitos na linhagem mais virulenta se deve ao fato de a bactéria mais virulenta possuir a capacidade de evasão da resposta imune, causando a morte dos hemócitos ao invés da contenção da infecção (Arteaga Blanco *et al.*, 2017) aumentando sua proliferação, como foi possível observar também com o CFU da linhagem selvagem, que foi maior do que o CFU das linhagens mutantes, sugerindo então que existe uma relação entre a proliferação das bactérias no interior das larvas com a contagem total de hemócitos, reforçando assim o perfil de atenuação das linhagens mutantes, que por sua vez apresentaram uma queda do CFU/larva ao longo do tempo, ao mesmo ponto que a contagem total de hemócitos aumenta no início do infecção e se estabiliza ao longo dos tempos de 4 e 8 horas pós inoculação.

Da mesma forma foi possível observar que a atividade da fenoloxidase, enzima precursora da mielinização, normalmente a primeira resposta imune de *G. mellonella*, teve um aumento nas larvas inoculadas com a linhagem selvagem SL1344, sugerindo que houve uma

resposta imune intensa a está linhagem ao longo do tempo do experimento. E os mutantes por sua vez apresentaram uma atividade da fenoloxidase, e consequentemente da mielinização, menor no mesmo período, assim como as larvas controle. Resultado semelhante ao encontrado por Raneri *et al* (Raneri *et al.*, 2018), que demonstrou que a fenoloxidase para a linhagem de referência de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou-se maior do que as linhagens mutantes, assim como Andrekjo *et al* que sugerem que a diferença da atividade de fenoloxidase das cepas testadas pode ter relação com a virulência da cepa (Andrejko *et al.*, 2014).

As observações histopatológicas de *G. mellonella*, demonstraram também que as larvas inoculadas com a linhagem SL1344 demonstraram maior injúria do tecido intestinal, e aumento dos pontos de mielinização durante o tempo do experimento, o que não foi possível de ser observado para as linhagens mutantes SL7207 e H683 + pYG3137, reforçando a atenuação desses mutantes e corroborando com os dados encontrados no trabalho de Card *et al* onde demonstrou-se que as larvas de *G. mellonella* inoculadas com estirpes de *Salmonella* Typhimurium apresentaram danos do tecido após 24 horas da infecção (Card *et al.*, 2016). Semelhante aos dados encontrados no trabalho de Ochoa *et al* que demonstrou que há uma diferença na resposta imune de *G. mellonella* de acordo com a virulência das espécies de *Helicobacter* e de acordo com o tempo pós infecção das larvas (Ochoa *et al.*, 2021)

Diante do exposto, demonstramos que a utilização de *G. mellonella* para a verificação da atenuação de linhagens de *Salmonella* Typhimurium com mutações $\Delta cya\Delta crp$, $\Delta cya\Delta crp\Delta asd$ e principalmente das mutações $\Delta aroA$ e $\Delta aroA\Delta asd$ é eficiente. É importante ressaltar que os mutantes aqui testados estão entre os mais utilizados no desenvolvimento de linhagens vacinais de *Salmonella enterica*, mas que ainda não haviam sido caracterizados no modelo de *G. mellonella*. Desta forma, a verificação desse modelo de infecção *in vivo* para estas linhagens fez necessária para um melhor entendimento do potencial desse modelo em análises iniciais do padrão de atenuação de linhagens com potencial vacinal, evidenciando também suas possíveis limitações. Como descrito por Lacharme-Lora *et al* as linhagens de *Salmonella* Typhimurium ST313 e ST19 no modelo de *G. mellonella* não reproduzem a mesma virulência encontrada nos hospedeiros humanos. De fato, que seja de nosso conhecimento, todos os estudos realizados com mutantes de *Salmonella enterica* e avaliados no modelo de *G. mellonella* e que demonstraram atenuação no modelo murino, também demonstraram atenuação no modelo de *G. mellonella*, incluindo os resultados obtidos neste presente estudo. *Salmonella* Typhimurium é um serovar “generalista”, capaz de infectar diferentes espécies animais, ao contrário da *Salmonella* Typhi que é um serovar hospedeiro específico, sendo uma característica desse

último serovar o acúmulo de pseudogenes que explicam, ao menos em parte, a adaptação a um nicho mais específico (Goodhead & Darby, 2015). Considerando que as linhagens ST313 também apresentam um processo de acúmulo de pseudogenes, foi sugerido que amostras dessas linhagens estão em um processo maior de adaptação ao hospedeiro humano, o que limita o seu estudo em modelos animais, incluindo *G. mellonella*, conforme apontam os dados na literatura (Lacharme-lora, 2019). Além disso, os dados obtidos por Seribelli e colaboradores demonstraram que isolados provenientes de humanos, com sequenciamento do tipo 313, apresentaram um perfil de virulência maior em *G. mellonella* em comparação com as cepas isoladas de alimentos, enquanto as cepas provenientes de alimentos com sequenciamento do tipo 19 apresentaram maior virulência (Seribelli et al., 2020) reforçando a hipótese de que há uma maior adaptação ao hospedeiro humano.

Essas limitações não são verificadas no caso de estudos envolvendo linhagens atenuadas, desta forma, a identificação da atenuação da virulência das linhagens vacinais aqui testadas no modelo de *G. mellonella*, que já foram verificadas em outros modelos reforça o uso de *G. mellonella* como modelo de avaliação inicial da virulência de mutantes desenvolvidos com propósito vacinal. Além disso, nossos dados indicam que não somente a DL50, mas a determinação da CFU/larva e de parâmetros como a atividade de hemócitos, ativação da fenoloxidase e dados histopatológicos são úteis na caracterização de linhagens com potencial vacinal no modelo de *G. mellonella*.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que a utilização de *G. mellonella* para avaliação da atenuação da virulência de mutantes de *Salmonella* Typhimurium, já conhecidos na literatura, é efetiva para as linhagens $\Delta cya\Delta crp$, $\Delta cya\Delta crp\Delta asd$, $\Delta aroA$ e $\Delta aroA\Delta asd$ validando assim o uso de *G. mellonella* como modelo de infecção inicial para as avaliações da virulência destas linhagens de forma alternativa aos modelos murinos.

REFERÊNCIAS

- Alikhan, N. F., Zhou, Z., Sergeant, M. J., & Achtman, M. (2018). A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genetics*, 14(4), 1–13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007261>
- Andrejko, M., Zdybicka-Barabas, A., & Cytryńska, M. (2014). Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115(1), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.006>
- Arteaga Blanco, L. A., Crispim, J. S., Fernandes, K. M., de Oliveira, L. L., Pereira, M. F., Bazzolli, D. M. S., & Martins, G. F. (2017). Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell and Tissue Research*, 370(1), 153–168.
<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2653-5>
- Asai, M., Li, Y., Khara, J. S., Gladstone, C. A., Robertson, B. D., Langford, P. R., & Newton, S. M. (2019). Use of the invertebrate *Galleria mellonella* as an infection model to study the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(148), 1–12.
<https://doi.org/10.3791/59703>
- Asai, M., Li, Y., Spiropoulos, J., Cooley, W., Everest, D. J., Kendall, S. L., Martín, C., Robertson, B. D., Langford, P. R., Newton, S. M., Asai, M., Li, Y., Spiropoulos, J., Cooley, W., David, J., Kendall, S. L., Martín, C., Robertson, B. D., Langford, P. R., ... Newton, S. M. (2022). *Galleria mellonella* as an infection model for the virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Virulence*, 13(1), 1543–1557. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2119657>
- Baliban, S. M., Lu, Y. J., & Malley, R. (2020). Overview of the nontyphoidal and paratyphoidal *Salmonella* vaccine pipeline: Current status and future prospects. *Clinical Infectious Diseases*, 71(day 28), S151–S154. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa514>
- Baud, D., Benyacoub, J., Revaz, V., Kok, M., Ponci, F., Bobst, M., Curtiss, R., De Grandi, P., & Nardelli-Haeffliger, D. (2004). Immunogenicity against Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles Is Strongly Enhanced by the PhoPc Phenotype in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, 72(2), 750–756.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.750-756.2004>
- Bender, J. K., Wille, T., Blank, K., Lange, A., Gerlach, R. G., & J. R. G. (2013). LPS structure and PhoQ activity are important for *Salmonella* Typhimurium virulence in the *Galleria mellonella* infection model [corrected]. *PloS One*, 8(8), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073287>
- Bergin, D., Brennan, M., & Kavanagh, K. (2003). Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes and Infection*, 5(15), 1389–1395.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.019>
- Besser, J. M. (2018). *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology*, 71, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>
- Bismuth, H. D., Brasseur, G., Ezraty, B., & Aussel, L. (2021). Bacterial Genetic Approach to the Study of Reactive Oxygen Species Production in *Galleria mellonella* During *Salmonella* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(March), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.640112>
- Calarga, A. P., Gontijo, M. T. P., de Almeida, L. G. P., de Vasconcelos, A. T. R., Nascimento, L. C., de Moraes Barbosa, T. M. C., de Carvalho Perri, T. M., dos Santos, S. R., Tiba-Casas, M. R., Marques, E. G. L., Ferreira, C. M., & Brocchi, M. (2022). Antimicrobial resistance and genetic background of non-typhoidal *Salmonella enterica* strains isolated from human infections in São Paulo, Brazil (2000–2019). *Brazilian Journal of Microbiology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00748-8>
- Card, R., Vaughan, K., Bagnall, M., Spiropoulos, J., Cooley, W., Strickland, T., Davies, R., &

- Anjum, M. F. (2016). Virulence characterisation of *Salmonella enterica* isolates of differing antimicrobial resistance recovered from UK livestock and imported meat samples. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00640>
- Chatfield, S., Roberts, M., Londono, P., Cropley, I., Douce, G., & Dougan, G. (1993). The development of oral vaccines based on live attenuated *Salmonella* strains. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 7(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0928-8244\(93\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0928-8244(93)90036-4)
- Clark-Curtiss, J. E., & Curtiss, R. (2018). *Salmonella* Vaccines: Conduits for Protective Antigens. *The Journal of Immunology*, 200(1), 39–48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600608>
- Coelho-castelo, A. A. M., Trombone, A. P. F., Rocha, C. D., & Lorenzi, J. C. C. (2009). Resposta imune a doenças infecciosas. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 42(2), 127–142. https://doi.org/10.7326/0003-4819-81-6-869_1
- Covone, M. G., Brocchi, M., Palla, E., Da Silveira, W. D., Rappuoli, R., & Galeotti, C. L. (1998). Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infection and Immunity*, 66(1), 224–231. <https://doi.org/10.1128/iai.66.1.224-231.1998>
- Cui, B., Liu, X., Fang, Y., Zhou, P., Zhang, Y., & Wang, Y. (2018). Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 17(4), 335–349. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1457443>
- Curtiss III, R., Goldschmidt, R. M., Fletchall, N. B., & Kelly, S. M. (1988). Avirulent *Salmonella typhimurium* Δ cya Δ crp oral vaccine strains expressing a streptococcal colonization and virulence antigen. *Vaccine*, 6(2), 155–160. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(88\)80020-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(88)80020-3)
- Curtiss, R., Galan, J. E., Nakayama, K., & Kelly, S. M. (1990). Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Research in Microbiology*, 141(7–8), 797–805. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(90\)90113-5](https://doi.org/10.1016/0923-2508(90)90113-5)
- Curtiss, R., & Kelly, S. M. (1987). *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infection and Immunity*, 55(12), 3035–3043. <https://doi.org/10.1128/iai.55.12.3035-3043.1987>
- Curtiss, Roy. (2002). Bacterial infectious disease control by vaccine development. *Journal of Clinical Investigation*, 110(8), 1061–1066. <https://doi.org/10.1172/JCI0216941>
- Curtiss, Roy, & Hassan, J. O. (1996). Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54(1–4), 365–372. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05683-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05683-8)
- Cutuli, M. A., Petronio Petronio, G., Vergalito, F., Magnifico, I., Pietrangelo, L., Venditti, N., & Di Marco, R. (2019). *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*, 10(1), 527–541. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621649>
- da Silva, F. P., Fernandes, K. M., de Freitas, L. L., de Souza Cascardo, R., Bernardes, R. C., de Oliveira, L. L., ... & Vanetti, M. C. D. (2021). Effects of sub-lethal doses of nisin on the virulence of *Salmonella enterica* in *Galleria mellonella* larvae. *Research in Microbiology*, 172(4–5), 103836. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103836>
- dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence Factors in *Salmonella Typhimurium*: The Sagacity of a Bacterium. *Current Microbiology*, 76(6), 762–773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 26, Issue 2, pp. 308–341). <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Galán, J. E., Nakayama, K., & Curtiss, R. (1990). Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in

- Salmonella* vaccine strains. *Gene*, 94(1), 29–35. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90464-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90464-3)
- Gast, R. K., & Porter Jr, R. E. (2020). *Salmonella* infections. In *Diseases of poultry*.
- Goodhead, I., & Darby, A. C. (2015). Taking the pseudo out of pseudogenes. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.012>
- Groisman, E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of Bacteriology*, 183(6), 1835–1842. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001>
- Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2018). *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host – A mini-review. *Food Microbiology*, 71, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.016>
- Hoiseth, S. K., & Stocker, B. A. D. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella* typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. In *Nature* (Vol. 291, Issue 5812, pp. 238–239). <https://doi.org/10.1038/291238a0>
- Hornsey, M., & Wareham, D. W. (2011). In vivo efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3534–3537. <https://doi.org/10.1128/AAC.00230-11>
- Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E. A., & Ochman, H. (2010). Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *Journal of Bacteriology*, 192(2), 560–567. <https://doi.org/10.1128/JB.01233-09>
- Johnson, S. A., Ormsby, M. J., & Wall, D. M. (2017). Draft Genome Sequence of the Tumor - Targeting *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain SL7207. *Genome Announcements*, 5(5)(e01591-16.), 1–2.
- Karem, K. L., Chatfield, S., Kuklin, N., & Rouse, B. T. (1995). Differential induction of carrier antigen-specific immunity by *Salmonella* typhimurium live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of BALB/c mice. *Infection and Immunity*, 63(12), 4557–4563. <https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4557-4563.1995>
- Kobylka, J., Kuth, M. S., Müller, R. T., Geertsma, E. R., & Pos, K. M. (2020). AcrB: a mean, keen, drug efflux machine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1459(1), 38–68. <https://doi.org/10.1111/nyas.14239>
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Gorges, S., & Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 749–795. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.62.1.749>
- Kröger, C., Dillon, S. C., Cameron, A. D. S., Papenfort, K., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., Chao, Y., Sittka, A., Hébrard, M., Händler, K., Colgan, A., Leekitcharoenphon, P., Langridge, G. C., Lohan, A. J., Loftus, B., Lucchini, S., Ussery, D. W., Dorman, C. J., Thomson, N. R., ... Hinton, J. C. D. (2012). The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 1277–1286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201061109>
- Lacharme-Lora, L., Owen, S. V., Blundell, R., Canals, R., Wenner, N., Perez-Sepulveda, B., ... & Hinton, J. C. (2019). The use of chicken and insect infection models to assess the virulence of African *Salmonella* Typhimurium ST313. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007540>
- Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*, 206, 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>
- Lee, H. S., Lee, S., Kim, J. S., Lee, H. R., Shin, H. C., Lee, M. S., Jin, K. S., Kim, C. H., Ku, B., Ryu, C. M., & Kim, S. J. (2019). Structural and physiological exploration of *Salmonella* typhi YfdX uncovers its dual function in bacterial antibiotic stress and virulence. *Frontiers in*

- Microbiology*, 9, 3329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03329>
- Liang, K., Liu, Q., Li, P., Luo, H., Wang, H., & Kong, Q. (2019). Genetically engineered *Salmonella* Typhimurium: Recent advances in cancer therapy. *Cancer Letters*, 448(2), 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.037>
- Lin, Z., Zhang, Y. G., Xia, Y., Xu, X., Jiao, X., & Sun, J. (2016). *Salmonella* enteritidis effector AvrA stabilizes intestinal tight junctions via the JNK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 291(52), 26837–26849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757393>
- López Hernández, Y., Yero, D., Pinos-Rodríguez, J. M., & Gibert, I. (2015). Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6, 38. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00038>
- Luo, Y., Kong, Q., Yang, J., Mitra, A., Golden, G., Wanda, S. Y., Roland, K. L., Jensen, R. V., Ernst, P. B., & Curtiss, R. (2012). Comparative genome analysis of the high pathogenicity *Salmonella* typhimurium strain UK-1. *PLoS ONE*, 7(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040645>
- Malmquist, J. A., Rogan, M. R., & McGillivray, S. M. (2019). *Galleria mellonella* as an Infection Model for *Bacillus anthracis* Sterne. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 360. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00360>
- Martin, L. B. (2012). Vaccines for typhoid fever and other salmonellosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(5), 489–499. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328356ffeb>
- Medina, E., Paglia, P., Nikolaus, T., Müller, A., Hensel, M., & Guzmán, C. A. (1999). Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella* typhimurium are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infection and Immunity*, 67(3), 1093–1099. <https://doi.org/10.1128/iai.67.3.1093-1099.1999>
- Meir, M., Grosfeld, T., & Barkan, D. (2018). (n.d.). Establishment and validation of *Galleria mellonella* as a novel model organism to study *Mycobacterium abscessus* infection, pathogenesis, and treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4)(e02539-17.), 1–9.
- Mittrucker, H. W., & Kaufmann, S. H. E. (2000). Immune response to infection with *Salmonella* typhimurium in mice. In *Journal of Leukocyte Biology* (Vol. 67, Issue 4, pp. 457–463). <https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.457>
- Ochoa, S., Fernández, F., Devotto, L., France Iglesias, A., & Collado, L. (2021). Virulence assessment of enterohepatic *Helicobacter* species carried by dogs using the wax moth larvae *Galleria mellonella* as infection model. *Helicobacter*, 26(4), 1–8. <https://doi.org/10.1111/hel.12808>
- Park, S., Jung, B., Kim, E., Hong, S. T., Yoon, H., & Hahn, T. W. (2020). *Salmonella* Typhimurium Lacking YjeK as a Candidate Live Attenuated Vaccine Against Invasive *Salmonella* Infection. *Frontiers in Immunology*, 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01277>
- Pereira, T. C., Barros, P. P. de, de Oliveira Fugisaki, L. R., Rossoni, R. D., Ribeiro, F. de C., Menezes, R. T. de, Junqueira, J. C., & Scorsoni, L. (2018). Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *Journal of Fungi*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/jof4040128>
- Prakoso, D., Zhu, X., & Rajeev, S. (2022). *Galleria mellonella* infection model to evaluate pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* strains. *Veterinary Microbiology*, 264, 109295. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109295>
- Ramachandran, G., Panda, A., Higginson, E. E., Ateh, E., Lipsky, M. M., Sen, S., Matson, C. A., Permala-Booth, J., DeTolla, L. J., & Tennant, S. M. (2017). Virulence of invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 in animal models of infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005697>
- Raneri, M., Pinatel, E., Peano, C., Rampioni, G., Leoni, L., Bianconi, I., Jousson, O.,

- Dalmasio, C., Ferrante, P., & Briani, F. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in glucose uptake have pleiotropic phenotype and altered virulence in non-mammal infection models. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35087-y>
- Rossoni, R. D., Ribeiro, F. de C., dos Santos, H. F. S., dos Santos, J. D., Oliveira, N. de S., Dutra, M. T. dos S., de Lapena, S. A. B., & Junqueira, J. C. (2019). *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens. *Archives of Oral Biology*, 101, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.03.002>
- Saha, P., Manna, C., Das, S., & Ghosh, M. (2016). Antibiotic binding of STY3178, a yfdX protein from *Salmonella* Typhi. *Scientific Reports*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep21305>
- Seribelli, A. A., Cruz, M. F., Vilela, F. P., Frazão, M. R., Paziani, M. H., Almeida, F., Cazentini Medeiros, M. I., dos Prazeres Rodrigues, D., von Zeska Kress, M. R., Allard, M. W., & Falcão, J. P. (2020). Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from humans and foods in Brazil. *PLoS ONE*, 15, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237886>
- Singkum, P., Suwanmanee, S., Pumeesat, P., & Luplertlop, N. (2019). A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 66(1), 31–55. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.001>
- Strugnell, R. A., Scott, T. A., Wang, N., Yang, C., Peres, N., Bedoui, S., & Kupz, A. (2014). *Salmonella* vaccines: Lessons from the mouse model or bad teaching? *Current Opinion in Microbiology*, 17(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.12.004>
- Takaya, A., Yamamoto, T., & Tokoyoda, K. (2020). Humoral Immunity vs. *Salmonella*. *Frontiers in Immunology*, 10, 3155. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03155>
- Tennant, S. M., & Levine, M. M. (2015). Live attenuated vaccines for invasive *Salmonella* infections. *Vaccine*, 33, C36–C41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.029>
- Thomas, S. R., & Elkinton, J. S. (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(3), 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.01.006>
- Thomaz, L., Gustavo de Almeida, L., Silva, F. R. O., Cortez, M., Taborda, C. P., & Spira, B. (2020). In vivo Activity of Silver Nanoparticles Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in *Galleria mellonella*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2798. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582107>
- Tian, Q., Wei, S., Su, H., Zheng, S., Xu, S., Liu, M., ... & Li, J. (2022). Bactericidal activity of gallic acid against multi-drug resistance *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 173, 105824. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105824>
- Tomiotto-Pellissier, F., Cataneo, A. H. D., Orsini, T. M., Thomazelli, A. P. F. dos S., Dalevedo, G. A., de Oliveira, A. G., Panagio, L. A., Costa, I. N., Conchon-Costa, I., Pavanelli, W. R., & Almeida, R. S. (2016). *Galleria mellonella* hemocytes: A novel phagocytic assay for *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. *Journal of Microbiological Methods*, 131, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.001>
- Tsai, C. M., & Frasch, C. E. (1982). A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 119, 115–119.
- Uno, G. (2020). Guest Commentary. *American Biology Teacher*, 82(7), 437. <https://doi.org/10.1525/abt.2020.82.7.437>
- Viegas, S. C., Mil-Homens, D., Fialho, A. M., & Arraiano, C. M. (2013). The virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the insect model *Galleria mellonella* is impaired by mutations in RNase E and RNase III. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 6124–6133. <https://doi.org/10.1128/AEM.02044-13>
- Wang-Kan, X., Blair, J. M. A., Chirullo, B., Betts, J., La Ragione, R. M., Ivens, A., Ricci, V., Opperman, T. J., & Piddock, L. J. V. (2017). Lack of AcrB efflux function confers loss of virulence on *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *MBio*, 8(4), 1–14.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00968-17>

Welkos, S., & O'Brien, A. (1994). Determination of median lethal and infectious doses in animal model systems. *Methods in Enzymology*, 235, 29–39. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35128-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35128-7)

Wojda, I. (2017). Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science*, 24(3), 342–357. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12325>

Wu, G., Liu, Y., Ding, Y., & Yi, Y. (2016). Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell*, 48(4), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.06.007>

Wu, L. J., Luo, Y., Shi, G. L., & Li, Z. Y. (2021). Prevalence, clinical characteristics and changes of antibiotic resistance in children with nontyphoidal *Salmonella* infections from 2009–2018 in Chongqing, China. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1403–1413.

<https://doi.org/10.2147/IDR.S301318>

Wu, S., Pascual, D. W., Vancott, J. L., McGhee, J. R., Maneval, D. R., Levine, M. M., & Hone, D. M. (1995). Immune responses to novel *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* vectors that express colonization factor antigen I (CFA/I) of enterotoxigenic *E. coli* in the Absence of the CFA/I positive regulator *cfaR*. *Infection and Immunity*, 63(12), 4933–4938. <https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4933-4938.1995>

Younghusband, H. B., & Lee, P. E. (1969). Virus-cell studies of *Tipula iridescent* virus in *Galleria mellonella* (L.). I. Electron microscopy of infection and synthesis of *Tipula iridescent* virus in hemocytes. *Virology*, 38(2), 247–254. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90366-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90366-3)

Zhang, X., Lou, Y. H., Koopman, M., Doggett, T., Tung, K. S. K., & Curtiss, R. (1997). Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3. *Biology of Reproduction*, 56(1), 33–41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.1.33>

Anexos

INFORMAÇÃO IB/CIBIO nº 5/2022



INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto **“2009/Tipo 2-01 - Construção e caracterização de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* Typhimurium: avaliação do potencial imunogênico e protetor”**, cujo pesquisador responsável é o **Prof. Dr. Marcelo Brocchi**, sub-projeto “O uso de *Galleria mellonella* como modelo de infecção in vivo por mutantes de *Salmonella enterica*”, da pós-graduanda **Isabella Carolina Rodrigues dos Santos Goes**, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,
29 de março de 2022.

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia - Unicamp

CIBio/IB-Unicamp
Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - Unicamp
Caixa Postal 6109 - 13083-862 Campinas SP
Tel.: (19) 3521-6359 – e-mail: comisib@unicamp.br

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 3080DED3 15EB4CCD A9D733FD A6AFB87E

Documento assinado eletronicamente por **JOSÉ LUIZ PROENÇA MODENA, PRESIDENTE DA CIBIO/IB/UNICAMP**, em 31/03/2022, às 16:43 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
3080DED3 15EB4CCD A9D733FD A6AFB87E

