



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Lucindo Cardoso de Pina

**Expressão e atividade de sistemas de dois componentes (TCS) de *Salmonella*
enterica sorovar Typhimurium no contexto do metaboloma
intestinal humano**

Rio de Janeiro

2020

Lucindo Cardoso de Pina

Expressão e atividade de sistemas de dois componentes (TCS) de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium no contexto do metaboloma intestinal humano

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luis Caetano Martha Antunes

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

P645 Pina, Lucindo Cardoso de.

Expressão e atividade de sistemas de dois componentes (TCS) de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium no contexto do metaboloma intestinal humano / Lucindo Cardoso de Pina. - 2020.

176 f.

Orientador: Luis Caetano Martha Antunes

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-graduação em Biociências.

1. Bacteriologia – Teses. 2. *Salmonella* Typhimurium – Teses. 3. Metaboloma. 4. Microbiota. I. Antunes, Luis Caetano Martha. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Lucindo Cardoso de Pina

Expressão e atividade de sistemas de dois componentes (TCS) de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium no contexto do metaboloma intestinal humano

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de agosto de 2020.

Banca examinadora: _____

Prof. Dr. Luis Caetano Martha Antunes (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Ana Paula D’Alincourt Carvalho Assef
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Rosana Barreto Rocha Ferreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

Estudar e viver nessa cidade linda, carinhosa e merecidamente chamada de cidade maravilhosa, com a agitação, o calor e perigo que a caracterizam, não foi fácil e, seria com certeza mais desafiador se não fosse a mão de Deus me indicando o caminho a seguir e a sua luz divina iluminando cada passo nessa caminhada. Por isso, primeiramente, queria agradecer a Deus por sempre estar presente e por ter me dado forças de olhar para frente, sempre com esperança, mesmo que os problemas, a falta da família e dos amigos e o estresse que é essa vida acadêmica insistam em encobrir a visibilidade à minha frente.

Quero agradecer do fundo do meu coração à minha mãe Ana Maria, que, mesmo com todas as dificuldades, deu tudo dela para cuidar dos oito filhos. Sacrificou muito para nos educar, e hoje sei que tudo o que eu fiz e vir a fazer, como forma de retribuição serão sempre uma mancha frente à pintura que ela fez em nos proporcionar a educação. Agradeço à memória do meu pai Manuel de Pina, que muito cedo nos deixou, quando a maior parte dos filhos eram ainda inocentes e crianças; mesmo tendo falecido cedo, deixou um exemplo que até hoje reflete na minha vida – que é de sonhar, continuar a sonhar, correr atrás dos sonhos e, sobretudo, respeitar cada pessoa do meu lado. Aqui também aproveito para agradecer todas as minhas irmãs e irmãos pela partilha de todos os momentos bons que hoje se traduz numa profunda saudade. Amo todos vocês.

Estar aqui no Rio de Janeiro me deu a oportunidade de conhecer e de conviver com pessoas maravilhosas, de estados e países diversos. Por isso queria aqui, carinhosamente, agradecer a todos que de algum modo ou motivo, me fizeram sorrir, me fizeram olhar, perceber e viver a vida de uma forma mais leve, alegre e paciente. Quero agradecer a todos do Laboratório de Bacteriologia da Tuberculose, no Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF), onde fui recebido e até hoje, mesmo não frequentando mais esse laboratório, recebo carinho de todos onde quer que encontre cada amigo que lá dentro fiz.

Morei no alojamento da Fiocruz no CRPHF em Jacarepaguá, e isso sem dúvidas marcou e vai estar sempre presente na minha vida. Conheci pessoas de todo o Brasil e de quatro continentes e dos seguintes países: Angola, Guiné Bissau, Moçambique, Gana, Tunísia, Nigéria, Paquistão, Espanha, Chile, Cuba, Colômbia, Peru, Paraguai, Argentina e República Dominicana. As pessoas de cada um desses países deixam em mim traços culturais dos respectivos países que hoje me fazem respeitar, ainda mais, cada país e cada cultura, me fazem assimilar o que é bom e me tornar uma pessoa melhor, mais sensível e com uma mente mais

aberta. Quero agradecer ao Ramon, Romão, Jeronimo, Diocreciano, Nédio, Breno e Júlio, que foram meus irmãos aqui no alojamento, às minhas queridas amigas Laila, Avohanne, Daiane, ôamylla, Thayane, Liliane e Carla. Quero agradecer também todo o pessoal que compartilhou o futebol na quadra (CRPHF) comigo.

Quero agradecer a todos do Laboratório de Biologia dos Anaeróbios, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, que em meio à tanta turbulência, me adotaram. Desconfiado de como entendiam meu sotaque de português de Portugal, minhas palavras eram escassas e a minha voz mal se ouvia no laboratório. Hoje me sinto membro dessa grande família, e não tenho problema nenhum em dizer que foi uma benção trabalhar esses anos todos num laboratório onde não parece haver mais espaço, mas sempre cabe mais uma pessoa. Meus agradecimentos aos Prof (a)s Regina, Eliane e Leandro por terem aceitado que desenvolvesse meu trabalho lá.

Quero agradecer a todos os membros do nosso grupo de pesquisa. Renata, Thiago, Fernanda, Duanne, Nicole, Amanda, Heidi e Eduardo (um grande irmão) que me ajudaram muito e serei sempre grato por todos vocês. O nosso grupo é bem unido e isso é um valor imensurável para que as coisas deem certo, pois a vitória de uns era de todos e os problemas que a cada momento pareciam sem soluções eram sempre resolvidos num espírito de “*djunta mon*”, juntar as mãos, como se diz em crioulo Cabo verdiano. Queria agradecer ao meu orientador Caetano, por ter aceitado me orientar, mesmo sem saber quem eu era. Quero agradecer por todo o suporte que me deu sempre que o solicitei. Aprendi bastante e todo esse aprendizado levarei para a vida.

Eu não poderia deixar de reservar um parágrafo para falar e agradecer a Amanda e a Nicole, duas irmãs que a vida me deu. Se eu começar a falar das histórias eu vou me estender. Por isso, queria falar sem rodeios que vocês têm um espaço e um carinho enorme no meu coração. Os dias perto de vocês lutando, para que tudo dê certo, só ficaram mais curtos e leves, mais alegres e divertidos porque vocês emitem uma energia positiva que sempre equilibrava a carga negativa que os meus problemas me faziam carregar nas costas.

Sei que muita gente ficou de fora nesse agradecimento. Mas, se eu trocasse cada palavra desse agradecimento pelo nome das pessoas que merecem meus agradecimentos, esse longo texto seria escrito só com os nomes dessas pessoas.

Muito obrigado a todos.

Curvas da vida

Entender a vida é difícil
Se o caminho fosse uma linha reta
Tudo seria mais fácil
As curvas estão em toda encosta

Para a vida, umas nascem na reta
Outras nascem e morrem na curva
Quando tentas permanecer na reta
Invejosos conspiram e te jogam de volta para a curva
Para umas, a porta já foi aberta
Outras com essa vida ingrata não contava

Nasci pobre
No seio de uma família nobre
Para a minha desgraça
Fechavam os olhos e achavam graça

Mas bem cedo aprendi
Quando uma porta se fecha abrem-se várias janelas
Mesmo sem o devido traje
Me sinto nas passarelas
E de mim dou tudo
Mesmo tendo pouco

A vida não me ensinou a acomodar na sombra
Nem a confiar na própria sombra
Para todos o sol nasce redondo
Só precisamos escolher o melhor ponto
Para pegar o melhor bronzeado

Aprendi a sair da cama com o cantar do galo
Aproveitar o máximo que o dia pode me oferecer
Atrás dos meus sonhos eu pedalo
Mesmo que a primeira subida me enfraquecer
Ei de encontrar energias para me fortalecer
E enfrentar as curvas da vida

Lucindo Cardoso de Pina

RESUMO

PINA, Lucindo Cardoso de. **Expressão e atividade de sistemas de dois componentes (TCS) de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium no contexto do metaboloma intestinal humano**. 2020. 176 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A interação entre membros do microbioma intestinal humano, células hospedeiras e patógenos invasores pode ocorrer de diversas formas, sendo uma delas através de pequenas moléculas chamadas metabólitos. A percepção e resposta efetiva de um microrganismo às diferentes condições encontradas em seu ambiente, incluindo metabólitos produzidos por outros microrganismos, são fatores importantes para sua adaptação, sobrevivência e disseminação. Os sistemas de dois componentes (TCS) permitem a percepção e resposta a mudanças ambientais, regulando a expressão de genes específicos. Nosso grupo mostrou anteriormente que um extrato orgânico de fezes humanas (EF), bem como o ácido 3,4-dimetilbenzoico (3,4-DMB), encontrado no EF, inibe a capacidade de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium de invadir células hospedeiras. O presente trabalho propôs investigar o impacto do microbioma intestinal humano, bem como de pequenas moléculas produzidas por *Clostridium citroniae* (membro deste microbioma) na expressão e atividade dos genes de TCS de *Salmonella*. Os metabólitos de EF e de culturas puras de *C. citroniae* foram extraídos com acetato de etila e adicionados a meio de cultura. O pH do meio foi ajustado (~ 7,4) e a solução foi esterilizada por filtração. *Salmonella* foi cultivada na presença ou ausência do EF e do extrato de *C. citroniae*, bem como do ácido 3,4-DMB, em condições aeróbias e anaeróbias, até alcançar o meio da fase logarítmica de crescimento. O RNA foi extraído para a realização de PCR em Tempo Real utilizando iniciadores direcionados a quase todos os TCS de *Salmonella*. Nossos resultados mostraram que vários genes de TCS envolvidos na virulência de *Salmonella* (SsrAB, EnvZ-OmpR, QseCB, PhoQP, TorSR, TtrRS) foram regulados diferencialmente por esses metabólitos, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias. EnvZ-OmpR, PhoPQ e SsrAB estão diretamente envolvidos na regulação das Ilhas de Patogenicidade 1 e 2 de *Salmonella*. QseCB é crucial para a detecção de quorum em *Salmonella*, de hormônios hospedeiros e para a regulação da motilidade (*swimming*). Vários outros TCS também foram regulados, incluindo TorSR e TtrRS, envolvidos na regulação da respiração anaeróbica de N-óxido de trimetilamina (TMAO) e tetratoato, respectivamente. Esses compostos são importantes para a sobrevivência de *Salmonella* no ambiente anaeróbico do intestino humano. Nossos resultados de avaliação de expressão gênica global de *Salmonella* cultivada na presença de ácido 3,4-DMB (aerobiose e anaerobiose) bem como na presença do EF em anaerobiose, mostraram que genes condicionados em SPI-1 e SPI-2, SPI-4 e alguns genes do TCS foram reprimidos, enquanto genes *marR*, *marB* e *marA* foram ativadas nessas condições. Adicionalmente, comparamos nossos resultados de RNAseq, de *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose, com resultados disponíveis da base de dados *Salmonella* Compendium. Ainda, a capacidade de *Salmonella* de adentrar e sobreviver dentro de células fagocíticas (macrófagos RAW 264.7) parece ser afetada pelas três condições testadas neste trabalho. Nossos resultados mostram que importantes vias de sinalização da virulência de *Salmonella* podem ser moduladas pelos metabólitos presentes no microbioma intestinal humano e abrem caminhos para novas pesquisas sobre a sinalização intercelular microbioma-patógeno no ambiente intestinal.

Palavras-chave: *Salmonella* Typhimurium. Sistema de dois componentes. Metaboloma. Microbioma.

ABSTRACT

PINA, Lucindo Cardoso de. **Expression and activity of two-component systems of *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium in the context of the human intestinal metabolome.** 2020. 176 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The interaction between members of the human gut microbiome, host cells and invading pathogens often occurs through small molecules, also called metabolites. The perception and effective response of a microorganism to the different conditions found in its environment, including metabolites produced by other microbes, is important for its adaptation, survival and dissemination. Two-component systems (TCS) allow the perception and response to environmental changes by regulating the expression of specific genes. Our group previously showed that organic extracts of human feces (EF) as well as the specific metabolite 3,4-dimethylbenzoic acid (3,4-DMB) found within the EF, inhibit the ability of *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium to invade host cells. In the present work, we investigated the impact of the human gut microbiome as well as small molecules produced by *Clostridium citroniae* (a member of this microbiome) on the expression and activity of *Salmonella* TCS genes. Metabolites (from feces or *C. citroniae* cultures) were extracted using ethyl acetate and added to culture medium. The pH of the medium was adjusted (~7.4), and the solution was filter sterilized. *Salmonella* was grown in the presence or absence of the organic extracts as well as 3,4-DMB acid under aerobic and anaerobic conditions until it reached mid-log growth. RNA was then extracted for Real-time PCR using primers targeting almost all *Salmonella* TCS. Our results showed that several TCS involved in *Salmonella* virulence (SsrAB, EnvZ-OmpR, QseCB, PhoQP, TorSR, TtrRS) were differentially regulated by these metabolites both in aerobic and anaerobic conditions. EnvZ-OmpR, PhoPQ, and SsrAB are directly involved in the regulation of *Salmonella* Pathogenicity Islands 1 and 2. QseCB is crucial for *Salmonella* quorum sensing, sensing of host hormones and regulation of swimming motility. Several other TCS were also regulated, including TorSR and TtrRS, which are involved in the anaerobic respiration of trimethylamine N-oxide (TMAO) and tetrathionate, respectively. These compounds are important for *Salmonella* survival in the anaerobic environment of the human gut. Our results of the evaluation of global *Salmonella* gene expression grown in the presence of 3,4-DMB acid (aerobiosis and anaerobiosis) as well as in the presence of EF in anaerobiosis, showed that genes encoded in SPI-1 and SPI-2, SPI-4 and some TCS genes have been repressed, while multiple drug resistance genes, as well *marR*, *marB* and *marA* genes have been activated under these conditions. Besides, we compared our results of RNAseq, *Salmonella* was grown in the presence of 3,4-DMB acid in aerobiosis, with results available from the *Salmonella* Compendium database. Also, *Salmonella*'s ability to enter and survive within phagocytic cells (macrophages RAW 264.7) appears to be affected by the three conditions tested in this work. Our results show that important *Salmonella* virulence signalling pathways can be modulated by the metabolites present in the human intestinal microbiome and open the way for further research on the microbiome-pathogen intercellular signalling in the intestinal environment.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium. Two-component system. Metabolome. Microbiome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura e funcionamento geral dos sistemas de dois componentes.....	43
Figura 2 -	Sistemas de dois componentes de <i>Salmonella</i>	45
Figura 3 -	Mapa representativo dos TCS em <i>Salmonella</i>	46
Figura 4 -	Curva de crescimento de SL1344 em anaerobiose.....	65
Figura 5 -	Curva de crescimento de SL1344 em aerobiose.....	66
Figura 6 -	Expressão relativa do gene <i>hilA</i> avaliada por RT-PCR.....	67
Figura 7 -	Rede de interação entre as principais proteínas envolvidas na regulação direta ou indireta dos genes codificados dentro da SPI-1	68
Figura 8 -	Rede de interação entre as proteínas sensoras quinsase de TCS de <i>Salmonella</i>	70
Figura 9 -	Expressão relativa do gene <i>arcB</i> (ArcBA) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	71
Figura 10 -	Expressão relativa do gene <i>baeS</i> (BaeSR) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	72
Figura 11 -	Expressão relativa do gene <i>basS</i> (RstBA) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	73
Figura 12 -	Expressão relativa do gene <i>barA</i> (BarA-SirA) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	74
Figura 13 -	Expressão relativa do gene <i>dcuS</i> (DcuSR) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	75
Figura 14 -	Expressão relativa do gene <i>glrK</i> (GlrKR) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	76
Figura 15 -	Expressão relativa do gene <i>hydH</i> (HydHG) de <i>Salmonella</i> . avaliada por RT-PCR.....	77
Figura 16 -	Expressão relativa do gene <i>kdpD</i> (KdpD-KdpE) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	78
Figura 17 -	Expressão relativa do gene <i>pgtB</i> (PgtAB) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	79
Figura 18 -	Expressão relativa do gene <i>rstB</i> (RstBA) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	80

Figura 19 -	Expressão relativa do gene <i>tctE</i> (TctED) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	81
Figura 20 -	Expressão relativa do gene <i>creC</i> (CreBC) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	82
Figura 21-	Expressão relativa do gene <i>cheA</i> (CheAB) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	83
Figura 22 -	Expressão relativa do gene <i>cpxA</i> (CpxAR) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	84
Figura 23 -	Expressão relativa do gene <i>glnG</i> (GlnGL) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	85
Figura 24 -	Expressão relativa do gene <i>narX</i> (NarXL) de <i>Salmonella</i> (100 µg/ml) avaliada por RT-PCR.....	86
Figura 25 -	Expressão relativa do gene <i>narQ</i> (NarQP) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	86
Figura 26 -	Expressão relativa do gene <i>phoR</i> (PhoRB) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	87
Figura 27 -	Expressão relativa do gene <i>rscC</i> (RcsBCD) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	88
Figura 28 -	Expressão relativa do gene <i>ttrS</i> (TtrSR) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	89
Figura 29 -	Expressão relativa do gene <i>uhpB</i> (UhpAB) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	90
Figura 30 -	Expressão relativa do gene <i>citA</i> (CitAB) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	91
Figura 31-	Expressão relativa do gene <i>envZ</i> (EnvZ-OmpR) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	92
Figura 32 -	Expressão relativa do gene <i>phoQ</i> (PhoPQ) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	93
Figura 33 -	Expressão relativa do gene <i>qseC</i> (QseCB) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	94
Figura 34 -	Expressão relativa do gene <i>ssrA</i> (SsrAB) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	96

Figura 35 -	Expressão relativa do gene <i>torS</i> (TorSR) de <i>Salmonella</i> avaliada por RT-PCR.....	97
Figura 36 -	Expressão relativa dos genes do operon <i>torCAD</i> na presença de ácido 3,4-DMB.....	98
Figura 37 -	Genes ativados pelo EF em anaerobiose.....	105
Figura 38 -	Genes SPI-1 e T3SS-1 reprimidos pelo EF em anaerobiose.....	106
Figura 39 -	Genes SPI-2 e TCS reprimidos pelo EF em anaerobiose.....	107
Figura 40 -	Genes ativados pelo ácido 3,4-DMB em anaerobiose.....	108
Figura 41 -	Genes SPI-1 e T3SS-1 reprimidos pelo ácido 3,4-DMB em anaerobiose..	108
Figura 42 -	Genes SPI-4, TCS e <i>mig-14</i> reprimidos pelo ácido 3,4-DMB em anaerobiose.....	109
Figura 43 -	Mapa genômico dos genes de virulência nas duas ilhas de patogenicidade de maior importância para a capacidade de invasão (SPI-1) e sobrevivência (SPI-2) de <i>Salmonella</i>	112
Figura 44	Análise comparativa da expressão de genes da SPI-2 de cepas de <i>Salmonella</i> (ST4/74, D23580 e SL1344) em condições que mimetizam o processo infeccioso.....	113
Figura 45	Análise comparativa da expressão de genes SPI-1 de cepas de <i>Salmonella</i> (ST4/74, D23580 e SL1344) em condições que mimetizam o processo infeccioso.....	119
Figura 46	Viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na presença de EF.....	122
Figura 47	Viabilidade de RAW 264.7 na presença de ácido 3,4-DMB.....	123
Figura 48	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> cultivada na presença de EF em macrófagos RAW 264.7.....	125
Figura 49	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> em macrófagos RAW 264.7 na presença de ECP de <i>C. citroniae</i>	126
Figura 50	Sobrevivência intracelular de <i>Salmonella</i> na presença do ácido 3,4-DMB	127
Figura 51 -	Resumo dos principais resultados do trabalho.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sistemas de dois componentes (TCS) em <i>Salmonella</i>	47
Tabela 2 -	Configuração da reação de PCR em Tempo Real (RT-PCR)	60
Tabela 3 -	<i>Primers</i> utilizados no estudo.....	61
Tabela 4 -	Resumo da expressão dos genes HK nas diferentes condições.....	99
Tabela 5 -	Genes de diferencialmente regulados pelo ácido 3,4-DMB.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ATR	Resposta de tolerância ácida
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Da	Daltons
DII	Doença Intestinal Inflamatória
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
3,4-DMB	Ácido 3,4-dimetilbenzoico
EF	Extrato Fecal
ECP	Extrato de cultura pura
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HK	Histidina quinase
H-NS	<i>Histone-like nucleoid structuring protein</i>
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
ILCs	Células Linfóides Inatas
IFN γ	Interferon gama
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
LB	Luria-Bertani
MAMPs	<i>Microbial-Associated Molecular Patterns</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption</i>
MCPs	Proteínas de quimiotaxia que aceitam metil
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NLRs	Receptores do Tipo NOD
ORFs	<i>Open Reading Frame</i>
P	Grupo Fosforil (Fosfato)

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RPM	Rotações por Minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RR	Regulador de Resposta
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RTA	Resposta de tolerância ao ácido
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SPI-1	<i>Salmonella Pathogenicity island 1</i>
SPI-2	<i>Salmonella Pathogenicity island 2</i>
SCV	<i>Salmonella-containing vacuole</i>
TMAO	<i>Trimethylamine Oxide</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
T3SS	<i>Type-3 Secretion System</i>
TCS	<i>Two-Component System</i>
TLRs	Receptores do Tipo Toll
VAP	<i>Vacuole Actin Polymerization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
MG	Miligramma
nm	Nanômetro
pH -	Potencial hidrogeniônico
<i>P</i>	Valor de <i>p</i>
~	Aproximadamente
↑	Alta concentração
↓	Baixa concentração
<i>TM</i>	<i>Trade Mark</i>
®	Marca Registrada
V/V	Razão volume/volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	19
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1	Microbiota humana.....	21
1.1.1	<u>Microbiota intestinal humana.....</u>	24
1.1.2	<u>Metaboloma intestinal humano.....</u>	28
1.1.3	<u>Ácido 3,4-dimetilbenzóico.....</u>	31
1.1.4	<u><i>Clostridium citroniae</i>.....</u>	31
1.2	Biologia de <i>Salmonella</i>.....	33
1.2.1	<u>Patogenicidade e fatores de virulência de <i>Salmonella</i>.....</u>	37
1.3	Sistemas regulatórios de dois componentes.....	42
2	JUSTIFICATIVA.....	50
3	OBJETIVOS.....	52
3.1	Objetivo geral.....	52
3.2	Objetivos específicos.....	52
4	METODOLOGIA.....	53
4.1	Amostras bacterianas utilizadas.....	53
4.2	Extração de metabólitos de fezes humanas.....	53
4.3	Condições de cultivo.....	54
4.3.1	<u>Cultivo de <i>Salmonella</i> na presença de extrato fecal em aerobiose e anaerobiose.....</u>	54
4.3.2	<u>Cultivo de <i>Salmonella</i> na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose.....</u>	55
4.3.3	<u>Cultivo de <i>Salmonella</i> na presença de extrato de cultura pura de <i>C. citroniae</i>.....</u>	56
4.3.3.1	Obtenção de extrato de cultura pura de <i>C. citroniae</i>	56
4.3.3.2	Cultivo de <i>Salmonella</i> na presença de extrato de cultura pura de <i>C. citroniae</i> em aerobiose.....	56
4.3.3.3	Cultivo de <i>Salmonella</i> na presença de extrato de cultura pura de <i>C. citroniae</i> em anaerobiose.....	57
4.4	Curvas de crescimento de <i>Salmonella</i> na presença do EF, ECP de <i>C. citroniae</i> e ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose.....	57

4.5	Extração de RNA para PCR em Tempo Real e sequenciamento de RNA.....	58
4.6	Comparação dos nossos resultados de RNAseq com base de dados disponíveis.....	61
4.7	Ensaio de viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na presença de EF, ECP de <i>C. citroniae</i> e ácido 3,4-DMB.....	62
4.8	Ensaio de sobrevivência de <i>Salmonella</i> em macrófagos RAW 264.7 na presença de EF.....	64
4.9	Análise estatística.....	64
5	RESULTADOS.....	65
5.1	Efeito de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i> no crescimento de <i>Salmonella</i> em aerobiose e anaerobiose.....	65
5.2	Efeito de EF, ECP de <i>C. citroniae</i> e do ácido 3,4-DMB na expressão do gene <i>hilA</i> de 1) <i>Salmonella</i>.....	66
5.3	Efeito de EF, ECP de <i>C. citroniae</i> e do ácido 3,4-DMB na expressão de genes de quinases sensoras dos TCS de <i>Salmonella</i>.....	69
5.3.1	<u>Genes pouco regulados</u>	70
5.3.1.1	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>arcB</i> (TCS ArcAB)	70
5.3.1.2	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>baeS</i> (TCS BarSR)	71
5.3.1.3	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>basS</i> (TCS BasSR)	72
5.3.1.4	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>barA</i> (TCS BarA-SirS)	73
5.3.1.5	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>dcuS</i> (TCS DcuSR)	74
5.3.1.6	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>glrK</i> (TCS GlrKR/QseEF)	75
5.3.1.7	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>hydH</i> (TCS HydHG)	76
5.3.1.8	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>kdpD</i> (TCS KdpDE)	77
5.3.1.9	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>pgtB</i> (TCS PgtAB)	78
5.3.1.10	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>rstB</i> (TCS RstBA)	78
5.3.1.11	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>tctE</i> (TCS TctDE)	80
5.3.2	<u>Genes moderadamente regulados</u>	81
5.3.2.1	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>creC</i> (TCS CreBC)	81
5.3.2.2	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>cheA</i> (TCS CheAB)	82
5.3.2.3	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>cpxA</i> (TCS CpxAR)	83
5.3.2.4	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>glnG</i> (TCS GlnGL)	84

5.3.2.5	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>narX</i> (TCS NarXL) e <i>narQ</i> TCS NarQP)	85
5.3.2.6	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>phoR</i> (PhoRB).....	87
5.3.2.7	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>rcsC</i> (TCS RcsBCD)	88
5.3.2.8	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>ttrS</i> (TCS TtrSR)	89
5.3.2.9	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>uhpB</i> (TCS UhpBA)	89
5.3.3	Genes muitos regulados	90
5.3.3.1	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>citA</i> (TCS CitAB)	90
5.3.3.2	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>envZ</i> (EnvZ-OmpR)	91
5.3.3.3	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>phoQ</i> (TCS PhoPQ)	92
5.3.3.4	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>qseC</i> (TCS QseCB)	93
5.3.3.5	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>ssrA</i> (TCS SsrAB)	94
5.3.3.6	Expressão relativa do gene quinase sensor <i>torS</i> (TCS TorSR)	96
5.3.4	Expressão relativa dos genes do operon <i>torCAD</i>	97
5.4	Genes diferencialmente regulados pelo ácido 3,4-DMB em aerobiose (transcriptoma)	101
5.5	Genes diferencialmente regulados pelo EF em anaerobiose (transcriptoma)	105
5.6	Genes diferencialmente regulados pelo ácido 3,4-DMB em anaerobiose (transcriptoma)	107
5.7	Comparação dos nossos resultados de RNAseq com outras bases de dados disponíveis	109
5.8	Viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i>	121
5.8.1	<u>Viabilidade de RAW 264.7 na presença de EF</u>	121
5.8.2	<u>Viabilidade de RAW 264.7 na presença de ácido 3,4-DMB</u>	122
5.9	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> cultivada na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i>, no ambiente intracelular de macrófagos RAW 264.7	123
6	DISCUSSÃO	126
6.1	Efeito de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i> na expressão de <i>hila</i>	129

6.2	Efeito de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i> em TCS envolvidos na invasão e sobrevivência em células hospedeiras.....	132
6.2.1	<u>Sistema de dois componentes EnvZ-OmpR.....</u>	134
6.2.2	<u>Sistema de dois componentes PhoPQ.....</u>	135
6.2.3	<u>Sistema de dois componentes SsrAB.....</u>	136
6.2.4	<u>Sistema de dois componentes RcsBCD.....</u>	139
6.3	Efeito de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i> em TCS envolvidos na respiração.....	140
6.3.1	<u>Sistemas de dois componentes TorSR e TtrSR.....</u>	140
6.3.2	<u>Sistemas de dois componentes NarQP e NarXL.....</u>	142
6.4	Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i> na expressão de genes de quinases sensores de TCS envolvidos em processos metabólicos.....	143
6.5	Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i> na expressão de genes quinases sensores de TCS envolvidos em processos de transporte.....	145
6.6.	Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i> na expressão de genes de quinases sensores de TCS envolvidos com resposta ao estresse e tolerância a metais pesados.....	145
6.7	Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de <i>C. citroniae</i> na expressão de genes de quinases sensores de TCS envolvidos com quimiotaxia e <i>quorum sensing</i>.....	146
6.8	Expressão gênica global de <i>Salmonella</i> na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose, EF e ácido 3,4-DMB em anaerobiose	147
6.9	Sobrevivência de <i>Salmonella</i> em macrófagos.....	148
	CONCLUSÃO.....	151
	REFERÊNCIAS.....	154
	ANEXO A - Condições que mimetizam o processo infeccioso Kröger <i>et al.</i> (2013).....	174
	ANEXO B - Condições que mimetizam o processo infeccioso Canals <i>et al.</i> (2019)	176

INTRODUÇÃO

Ao longo do processo evolutivo, as bactérias vivenciaram condições ambientais inóspitas e o tempo todo tiveram que modular e readaptar todas as suas maquinarias genéticas de forma a suportarem estresses de naturezas físico-químicas diversas que colocavam em xeque as suas capacidades adaptativas e de sobrevivência. As condições desafiadoras de ambientes que pareciam inabitáveis, como por exemplo os ambientes com alto teor salino, temperaturas extremas, ácidos, pobres em nutrientes, altas concentrações de metais pesados e outros compostos químicos altamente tóxicos, foram e continuam sendo um desafio que as bactérias precisam vencer para sobreviver. Além destas condições ambientais, as bactérias vivem em ambientes caracterizados, na maioria das vezes, por intensas interações, principalmente de natureza química, que podem ser saudáveis, competitivas e muitas vezes prejudiciais para um dos membros da interação. Para sentir as condições ambientais, como os compostos químicos produzidos por outras bactérias, a disponibilidade ou não de nutrientes essenciais, entre outros., as bactérias desenvolveram sofisticados sistemas de sinalização que lhes permitem uma regulação rigorosa da sua expressão gênica. Essas capacidades sensoriais evoluíram de forma a permitir que as bactérias obtenham informações do ambiente que as rodeia e traduzam essas informações em comportamentos benéficos mediante uma avaliação rápida e eficaz dos benefícios e custos de qualquer situação ou condição ambiental em que elas se encontrem. Isso permite às bactérias se adaptarem à dinâmica das mudanças ambientais, a fim de maximizar suas chances de sobrevivência. Por outro lado, outra vantagem de uma regulação gênica rigorosa é o fato de minimizar o custo metabólico desse processo, ao garantir que somente genes necessários para responder a uma situação específica sejam expressos.

Dentre os vários sistemas de sinalização de que dispõem as bactérias, destaca-se um onipresente e fundamental para a sua biologia: os sistemas de dois componentes (*Two-Component System* – TCS). A composição clássica dos TCS integra duas proteínas. Uma delas, frequentemente associada à membrana citoplasmática, sente o sinal ou estímulo do ambiente externo, e é chamada de histidina quinase sensora (*Sensor Histidine Kinase* – HK). A outra proteína está presente no citoplasma da célula, e é chamada proteína reguladora de resposta (*Response Regulator* – RR), por ser a proteína efetora que regula a expressão gênica em resposta ao estímulo recebido pela HK.

Bactérias causadoras de infecções intestinais, como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (espécie modelo do nosso estudo) são desafiadas de diferentes formas ao longo do trato gastrointestinal até que sejam capazes de se instalar neste ambiente. A percepção e resposta às diferentes condições encontradas são, em grande parte, reguladas pelos TCS. Neste trabalho, propomos investigar como pequenas moléculas produzidas pela microbiota intestinal humana e presentes em um extrato fecal humano (EF) afetam a expressão dos genes que codificam os HK. Além disso, avaliamos também o impacto de um metabólito presente no EF e anteriormente identificado por nosso grupo, o ácido 3,4-dimetilbenzóico (ácido 3,4-DMB) na expressão desses genes. Por último, avaliamos o impacto de extratos de cultura pura (ECP) de uma espécie pertencente à microbiota intestinal, *Clostridium citroniae* na expressão de genes de HK. Além disso, propomos investigar como esses metabólitos da microbiota intestinal humana afetam a capacidade de *Salmonella* de sobreviver em macrófagos, fagócitos profissionais usados pela bactéria para se disseminar para outros órgãos do corpo hospedeiro.

O entendimento de como pequenas moléculas produzidas por membros da microbiota intestinal modula a expressão de genes importantes para a virulência de *Salmonella* abre caminhos para uma compreensão mais profunda dos fenômenos utilizados por patógenos para regular sua expressão gênica para se adaptar e sobreviver num ambiente complexo e desafiador.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Microbiota humana

Segundo o poeta e metafísico inglês John Donne (1572-1631), “nenhum homem é uma ilha”. Essa afirmação pode ser estendida para todos os organismos e microrganismos em um ecossistema. Nenhum dos seres vivos que habitam os diversos ecossistemas da Terra existe como um ser isolado. Independente do habitat onde cada um vive, há sempre complexas interações entre organismos que compartilham um mesmo ecossistema, e o ciclo de vida de cada um desses organismos é influenciado diretamente pelo tipo de interação que ele estabelece. O comportamento, a dieta e nutrição, os metabólitos produzidos, os sistemas de ataque e defesa, entre outros, influenciam tanto os organismos quanto o ecossistema no seu todo. Essas interações são tão antigas quanto a própria existência dos organismos e, ademais, muitas dessas interações são críticas para a sobrevivência tanto do indivíduo quanto dos que com ele interagem. Os seres humanos vivem em um mundo microbiano, e os microrganismos do meio ambiente estão em contato permanente com a pele e as superfícies mucosas do nosso corpo (Hooper; Gordon, 2009). Os humanos, assim como os outros mamíferos, abrigam complexas comunidades de microrganismos tanto nas superfícies externas quanto em todas as cavidades internas do corpo que estão em contato direto ou indireto com o ambiente externo. Nestas comunidades de microrganismos estão presentes indivíduos de todos os domínios, *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (protozoários e fungos) bem como os vírus (Gilbert *et al.*, 2018)

Mais de 100 trilhões (10^{14}) de microrganismos simbiotes colonizam a superfície e as cavidades do nosso corpo que estão em contato com o ambiente externo. Essas complexas e diversas comunidades de microrganismos desempenham papéis importantes, tanto na saúde quanto como agentes etiológicos diretos ou indiretos de doença no hospedeiro humano (O’Hara; Shanahan, 2006). A complexidade, dinâmica na interação, composição, diversidade de espécies e funções são características que diferem, essencialmente, de acordo com a localização geográfica, idade, sexo, raça, estado de saúde e a dieta do hospedeiro. Avanços importantes na abordagem e nas técnicas de estudos da microbiota humana mostram que esta é composta por aproximadamente 150 vezes mais genes do que o genoma humano completo (O’Hara; Shanahan, 2006; Wang *et al.*, 2017). Esta diferença na quantidade de genes, por exemplo, entre o microbioma intestinal e o genoma humano, gera maior versatilidade genética que se traduz

numa maior plasticidade da função metabólica (Gill *et al.*, 2006) e fornece enzimas e vias metabólicas alternativas importantes para a homeostase (O'Hara; Shanahan, 2006). Estudos recentes têm mostrado e gerado enorme quantidade de dados que relacionam a microbiota intestinal com processos biológicos básicos e essenciais para a saúde e como causa de doença no hospedeiro através de vários mecanismos (Gill *et al.*, 2006). A versatilidade de fenótipos metabólicos e a maquinaria enzimática da microbiota intestinal tem o potencial de aumentar a extração de energia dos alimentos, por degradar macromoléculas complexas não metabolizadas pelo hospedeiro (ex: carboidratos complexos), aumentar a produção e coleta de nutrientes e alterar a sinalização do apetite (Gill *et al.*, 2006). A microbiota intestinal promove uma barreira física que protege o hospedeiro contra patógenos invasores através de exclusão competitiva¹ ou resistência à colonização e produção de substâncias antimicrobianas (Schauber, *et al.*, 2003; Cash *et al.*, 2006). Outro papel essencial e crítico é a contribuição indispensável na imunomodulação da mucosa intestinal e do sistema imunológico do hospedeiro (Backhed *et al.*, 2005; Bouskra *et al.*, 2008). A mucosa intestinal possui células epiteliais que secretam muco como uma camada protetora espessa. Dentre as diversas funções da mucosa intestinal destaca-se o papel na absorção e transporte de nutrientes, na manutenção da umidade dos tecidos e na proteção do corpo contra patógenos e partículas estranhas (Kong; Zhang; Zhang, 2018). A importância da mucosa intestinal na proteção do hospedeiro contra patógenos invasores bem como sua função moduladora do sistema imunológico será abordada com maior detalhe mais a frente nesse trabalho.

A microbiota humana tem um profundo impacto na fisiologia do hospedeiro. Na sua composição estão presentes tanto microrganismos benéficos quanto oportunistas, que interagem constantemente entre si e com células do hospedeiro. O equilíbrio e a boa interação entre os membros da microbiota e o hospedeiro estão na fronteira entre a saúde e a causa direta ou indireta de várias doenças. Alteração na diversidade e abundância dos membros da microbiota pode levar ao desenvolvimento de processos inflamatórios que têm consequências negativas para o hospedeiro e que muitas vezes se traduzem em processos que estão na origem de doenças que afetam diversos órgãos (Botero Palacio *et al.*, 2015). O corpo humano adulto contém pelo menos 1.000 espécies diferentes de bactérias conhecidas. Os membros da microbiota, assim como é comum entre os procariotos, interagem e transferem genes entre si,

¹Os microrganismos vivem em interações constantes e importantes para a sobrevivência e perpetuação deles. Algumas linhagens vivem em relações simbióticas; porém, outros podem manter uma batalha feroz, resultando numa guerra implacável para conquistar recursos finitos como nutrientes, luz e espaço. Uma cepa é competitiva se apresentar fenótipos que causam uma diminuição da aptidão em uma ou outra cepa concorrente (Wiles *et al.*, 2016; Bauer *et al.*, 2018).

o que aumenta ainda mais a complexidade, a dinâmica e a versatilidade do microbioma e que reflete no aumento da capacidade de adaptação, competição, virulência etc. (Wang *et al.*, 2017).

A colonização do corpo humano inicia-se no momento do nascimento. Cada indivíduo é colonizado por uma variedade de microrganismos que constituem uma parte vital do hospedeiro ao longo da vida. Durante e logo após o nascimento, recém-nascidos são expostos a microrganismos maternos e ambientais que iniciam o estabelecimento da microbiota humana. Essa etapa inicial de colonização é influenciada por fatores relacionados à forma de nascimento, como por exemplo cesariana ou parto normal, assim como prematuridade (Botero Palacio *et al.*, 2015; Neu, 2016; Gilbert *et al.*, 2018). No primeiro ano de vida, estima-se que 10^{13} a 10^{14} microrganismos, compreendendo 500 a 1.000 espécies, colonizam o trato gastrointestinal. Após o desmame, a microbiota intestinal se torna firmemente estabelecida, levando a uma assinatura de microbioma vitalícia em indivíduos saudáveis (Gilbert *et al.*, 2018).

Cada local do corpo tem características fisiológicas e bioquímicas específicas, o que faz com que cada local tenha comunidades bacterianas altamente especializadas para se adaptarem a essas características. A comparação da microbiota em um determinado local do corpo entre indivíduos de uma população mostra que há uma grande semelhança tanto na diversidade quanto abundância de cada espécie (Gilbert *et al.*, 2018). Durante o desenvolvimento humano, a microbiota humana seguiu trajetórias específicas no corpo, de modo que cada local desenvolveu uma biogeografia específica. A pele, por exemplo, mostra grande variação na composição e na estrutura da microbiota em diferentes locais, como resultado de diferentes características físicas, bioquímicas e topográficas. Estes fatores contribuem para criar essa variabilidade da microbiota entre cada local, bem como desempenham um papel importante na formação da individualidade da microbiota, de modo que cada pessoa desenvolva uma assinatura microbiana única em sua pele, independentemente das diferenças entre os locais da pele (Grice *et al.*, 2010; Grice; Segre, 2011). A caracterização longitudinal da microbiota do trato gastrointestinal humano mostrou que cada local tem uma microbiota característica, que em adultos permanece relativamente estável e única para cada pessoa, o que contrasta com a drástica mudança nos primeiros três anos de vida (Sekirov *et al.*, 2010; Gilbert *et al.*, 2018).

A microbiota vaginal tem um grau de estabilidade semelhante ao da microbiota da pele, sendo possível identificar pequenas mudanças na microbiota vaginal como indicativo de uma condição patológica. A microbiota vaginal de mulheres assintomáticas tende a ser dominada por espécies individuais de *Lactobacillus* e diversos anaeróbios. Acredita-se que os *Lactobacillus* beneficiam o hospedeiro ao diminuir o pH vaginal através de produtos de

fermentação, reduzindo assim a probabilidade de colonização microbiana alóctone ou invasão de patógenos (Avershina *et al.*, 2017; Gilbert *et al.*, 2018).

A composição da microbiota humana é única em cada indivíduo e as diferenças entre indivíduos são maiores do que as diferenças típicas que surgem dentro de uma pessoa ao longo do tempo (Lloyd-price; Abu-Ali; Huttenhower, 2016).

1.1.1. Microbiota intestinal humana.

Estamos vivendo numa época de grandes mudanças. Estamos explorando cada vez mais os confins do universo e podemos viajar entre continentes em horas, explorar as profundezas dos oceanos, usar plataformas de comunicação que nos permitem estar conectados e globalizados, mas também estamos deteriorando, aquecendo a Terra e esgotando seus oceanos e florestas a um ritmo sem precedentes. Essas grandes mudanças representam o preço do progresso tecnológico do século passado, que elevou o nível da poluição a níveis jamais registrados. Também começamos a explorar o universo microscópico dentro de nós. Os principais motores dessas mudanças e como cada um contribui para essas mudanças são hoje focos de estudos de vários grupos de pesquisas (Blaser; Falkow, 2009).

O intestino humano é colonizado por uma complexa comunidade de microrganismos, que influenciam direta ou indiretamente diversos processos críticos para a manutenção da homeostase e fisiologia do corpo humano no seu todo. Por este motivo a microbiota intestinal é tida, por diversos pesquisadores, como um órgão esquecido (negligenciado) dentro do corpo humano (O'Hara; Shanahan, 2006). Embora a microbiota intestinal seja geralmente estável em indivíduos saudáveis ao longo do tempo e de gerar condições que desfavorecem a colonização por patógenos entéricos, processo conhecido como resistência à colonização, vários fatores podem perturbar a sua estabilidade. Após a perturbação da microbiota intestinal, a resistência à colonização pode ser interrompida temporariamente e os patógenos podem ganhar a oportunidade de crescer a níveis elevados. O equilíbrio mantido na microbiota intestinal pode ser alterado devido a perturbações externas que podem ter um forte impacto na sua estabilidade e integridade (Stecher, 2015). Dentre os fatores mais importantes, destaca-se a dieta, fatores ambientais, estado de saúde e antibióticos. Estudos mostram que mudanças na dieta tem um profundo impacto na microbiota. Por exemplo, estudos em camundongos mostraram que a mudança para uma dieta rica em gordura e açúcar pode alterar a microbiota em um dia. Os

resultados em humanos foram semelhantes, onde verificaram que a mudança de uma dieta rica em gordura/pobre em fibras para uma dieta com pouca gordura e muita fibra causou mudanças notáveis na microbiota intestinal em 24 horas (Wang *et al.*, 2011). A dieta também influencia a abundância de certas espécies em detrimento de outras. Indivíduos com uma dieta rica em gordura animal têm maior abundância de *bacteroides*, enquanto uma dieta rica em carboidratos está associada a espécies de *Prevotella* (Wang *et al.*, 2011).

Como foi citado no parágrafo anterior, o uso de antibióticos é um fator com profundo impacto na estabilidade da microbiota. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 teve um impacto imensurável na melhoria da saúde pública mundial, tendo mudado o curso da medicina e permitido aos médicos tratar infecções anteriormente graves e com risco de morte, como endocardite bacteriana, meningite, pneumonia pneumocócica, gonorreia e sífilis. Entretanto, os patógenos bacterianos adquiriram rapidamente a capacidade genética para sobreviver ao tratamento com antibióticos, devido a fortes pressões seletivas resultantes do uso generalizado e descontrolado destas drogas. Paradoxalmente ao aumento da incidência de infecções por cepas bacterianas resistentes aos antibióticos, a taxa de descobertas de novos antibióticos está diminuindo (Langdon; Crook; Dantas, 2016). Como já citado anteriormente, em um indivíduo saudável, os membros da microbiota interagem entre si, interagem com patógenos invasores e com células do hospedeiro. Porém, há um equilíbrio nessa interação, fazendo com que os membros da microbiota convivam beneficiando-se mutuamente, e impedindo a invasão por parte de patógenos. O uso de antibióticos quebra este equilíbrio e diminui a resistência à colonização, função garantida pela microbiota intestinal, abrindo espaços para que microrganismos estranhos e oportunistas superem as bactérias comensais para causar mudanças transitórias na estrutura da microbiota e levando a diferentes estados de doença. O uso repetido de antibióticos em humanos aumenta ainda o reservatório de genes de resistência aos antibióticos em nosso próprio microbioma (Sommer; Dantas; Church, 2016).

O uso de antibiótico reside na interseção da saúde pessoal e pública. Martin J. Blaser fez uma comparação entre os antibióticos e uma espada de quatro gumes contra as bactérias. Os dois primeiros gumes da espada antibiótica foram identificados imediatamente após a sua descoberta, e a implementação do uso terapêutico dos antibióticos não só beneficiou o indivíduo no tratamento de sua infecção, mas também beneficiou a comunidade na prevenção da propagação desse agente infeccioso. O terceiro gume já foi reconhecido por Alexander Fleming em 1945 em seu discurso de aceitação do prêmio Nobel, tendo alertado sobre o custo para a sociedade do uso descontrolado de antibiótico e consequente aparecimento e evolução da

resistência. Esse custo tem vindo a aumentar ano após ano. Muitos antibióticos hoje já não são mais eficazes para tratamento de infeções clinicamente importantes para as quais eram usados. Entretanto, o quarto gume da espada antibiótica permaneceu pouco explorado até recentemente, isto é, o custo que um antibiótico exerce sobre a saúde de um indivíduo através dos danos colaterais do mesmo em bactérias que normalmente vivem e coevoluíram com os humanos, a nossa microbiota (Blaser, 2016). Um estudo observacional, clínico e epidemiológico em crianças pequenas forneceu evidências robustas de que a exposição a antibióticos está associada ao aumento do risco de uma variedade de doenças, incluindo a obesidade, diabetes tipo 1 e 2, doenças inflamatórias intestinais diversas, doença ílica, alergias, asma e mais recentemente doenças neurológicas, como autismo (Toh; Allen-Vercoe, 2015).

Outro paradoxo relativo ao uso de antibióticos está no fato de que o momento em que o seu uso per capita é mais intensivo acontece precisamente nos dois primeiros anos de vida, em que as consequências são mais severas e podem ter uma repercussão negativa por toda a vida (Blaser; Falkow, 2009). Um estudo do impacto do tratamento de camundongos com uma dose única de 20 mg de estreptomicina mostrou que após 12 horas de tratamento, 95% das populações microbianas intestinais tinham sido eliminados e a recuperação dessa população só começou depois do sexto dia após o tratamento. Além da drástica diminuição na diversidade e na abundância da microbiota intestinal, vias metabólicas importantes para a manutenção da homeostase foram severamente afetadas (Antunes *et al.*, 2011).

A microbiota intestinal desempenha várias funções para a manutenção do equilíbrio homeostático e para a fisiologia normal de vários sistemas e do organismo como um todo, como resultado de milhões de anos de coevolução marcados por relações mutualísticas (Jandhyala *et al.*, 2015; Lloyd-price; Abu-Ali; Huttenhower, 2016). Dentre as principais funções desempenhadas pela microbiota intestinal está a modulação do sistema imunológico. Inicialmente, todos os microrganismos eram vistos como patógenos que causam e propagam doenças infecciosas e, como campo, a imunologia foi construída em torno do paradigma de que o sistema imune do hospedeiro deveria reconhecer e eliminar esses intrusos (*non-self*) enquanto tolerava automoléculas para preservar a homeostase (Cerf-Bensussan; Gaboriau-Routhiau, 2010; Cresci; Izzo, 2019).

A interação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico do hospedeiro é sem dúvida um dos principais desafios no entendimento do conceito que outrora se tinha das bactérias, sempre vistas como causadores de doenças (Wu; Wu, 2012; Fawcner-Corbett; Simmons; Parikh, 2017). A pergunta pertinente que aparece logo é: se assim fosse e, tendo em

conta que temos mais células microbianas do que células humanas vivendo no nosso corpo, por que é que estas bactérias não são eliminadas pelo sistema imunológico? Nesse contexto, deve-se, antes de tudo, entender que as células epiteliais são um componente central do sistema imunológico do intestino. De um modo semelhante às células imunológicas, as células epiteliais expressam receptores para padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs – *Microbial-Associated Molecular Patterns*). As células epiteliais do intestino formam uma barreira físico-química potente e induzível, que limita o crescimento microbiano e o acesso à superfície do intestino. Podem ainda recrutar leucócitos para complementar sua função de barreira ou participar da ativação de respostas imunes adaptativas do intestino (Fawcner-Corbett; Simmons; Parikh, 2017).

Interações recíprocas da microbiota intestinal e do sistema imunológico são, sem dúvida, umas das relações que refletem como a evolução moldou o sistema imunológico adaptativo dos vertebrados para estabelecer uma relação complexa, porém simbiótica e equilibrada. O reconhecimento, por parte de células imunológicas do hospedeiro, de padrões moleculares conservados nos membros da microbiota normalmente são os principais fatores que definem a especificidade e memória que caracterizam a imunidade adaptativa. A especificidade e memória das células imunológicas proporcionaram aos vertebrados os mecanismos para adaptarem de maneira eficiente às respostas imunes a diversos tipos de microrganismos, seja para promover o mutualismo ou a defesa do hospedeiro. Porém, a fronteira que separa esses mesmos atributos de colocar o hospedeiro em risco de doenças imunomediadas é estreita e cada vez mais ligada à microbiota intestinal (Maynard *et al.*, 2012).

O nosso sistema imunológico coevoluiu com a nossa microbiota intestinal, não apenas para criar defesas contra patógenos, mas também para desenvolver tolerância a microrganismos benéficos dessa microbiota. Como consequência, o sistema imunológico e a microbiota intestinal desenvolveram uma relação mutualística, regulando-se e cooperando. A importância dessa interação é claramente destacada pelo fato de que 70 a 80% das células imunológicas são encontradas no intestino (Ley; Peterson; Gordon, 2006; Lazar *et al.*, 2018). Embora diferentes tipos de células epiteliais sejam encontrados ao longo do intestino, a arquitetura sofisticada e alguns tipos celulares são exclusivos de certas regiões, o que faz com que cada parte do intestino tenha funções distintas de regiões bem próximas ou adjacentes. Ao longo do intestino, são encontradas células quimiossensíveis, tais como como enterócitos, tipo celular mais proeminente no epitélio intestinal (também chamados de colonócitos no colón) e que

desempenham papel fundamental na absorção de nutrientes e água; células caliciformes, que secretam mucinas; células enteroendócrinas que secretam hormônios (Allaire *et al.*, 2018).

A estreita relação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico da mucosa intestinal já é conceito amplamente estudado e bem estabelecido. A mucosa pode ser considerada um nicho imunológico abrigando um “órgão” imuno-funcional composto por subpopulações de células T e suas citocinas anti e pró-inflamatórias relacionadas, além de vários outros mediadores da inflamação inerentes à microbiota (Cerf-Bensussan; Gaboriau-Routhiau, 2010; Cianci *et al.*, 2018). Ambos os sistemas imunes, inato e adaptativo, estão diretamente envolvidos no nicho imunológico intestinal. Várias barreiras protegem o nicho imunológico da invasão por patógenos. Na linha de frente, existe uma barreira mecânica fornecida pela camada de muco com peptídeos antimicrobianos, como alfa-defensinas, além de IgA secretora. Neutrófilos e células linfoides inatas (ILCs) representam outra linha celular defensiva (Cerf-Bensussan; Gaboriau-Routhiau, 2010; Cianci *et al.*, 2018).

Receptores de reconhecimento de padrões associados a linfócitos e células dendríticas e macrófagos, como receptores do tipo Toll (*Toll Like Receptors* – TLRs) e receptores semelhantes a NOD (NLRs), fornecem uma barreira adicional ao ativar tanto a imunidade inata como a adaptativa. Todas as células ativadas por antígenos bacterianos têm mecanismos comuns que determinam uma resposta imune adaptativa pró-inflamatória envolvendo várias subpopulações de células T, como são os casos de T helper 1 e 17 (Th1 e Th17), e suas citocinas relacionadas, tais como IL-1, IL-2, IL-15, IL-17, IL-23 (Cianci *et al.*, 2018).

O prêmio Nobel de 2005 em fisiologia e Medicina, concedido a Robin Warren e Barry Marshall é um lembrete de que a solução para algumas doenças humanas não reside única e exclusivamente no entendimento da fisiopatologia do hospedeiro, mas pode ser encontrada na interface com o ambiente microbiano. A manipulação da microbiota está se tornando uma estratégia terapêutica e profilática realista para muitas doenças infecciosas, inflamatórias e até neoplásicas (O’Hara; Shanahan, 2006).

1.1.2. Metaboloma intestinal humano.

Metabólitos são tipicamente biomoléculas de baixo peso molecular (<1.500 Da). São as peças de construção do genoma, proteoma e membranas celulares, desempenham papéis-chave

na biologia, como moléculas de sinalização, fontes de energia e intermediários metabólicos. A quantificação dos seus níveis fornece informações integrativas sobre funções biológicas e definem os fenótipos de sistemas biológicos em resposta a mudanças genéticas ou ambientais (Kim *et al.*, 2016).

Metabólitos são produtos e substratos de reações bioquímicas diversas e comumente relacionadas à biologia básica do genoma e proteoma. Abordagens metabolômicas têm como objetivo explorar as interações químico-biológicas e entender os papéis dos metabólitos na pesquisa básica, translacional e clínica. Metabólitos têm desempenhado papéis muito importantes em aplicações clínicas, sendo usados em mais de 95% dos ensaios clínicos. O exemplo mais representativo seria a determinação do nível de glicose no sangue em pacientes com diabetes. As drogas mais comuns usadas hoje ainda são pequenas moléculas, e mais da metade delas são derivadas de metabólitos (Kim *et al.*, 2016). Doenças humanas estão relacionadas a interações desfavoráveis do genoma ou proteoma com metabólitos, e um metabolismo desordenado está envolvido em muitos distúrbios genéticos (Kim *et al.*, 2016).

Como já é bem descrito, a microbiota intestinal é um ecossistema com uma composição e dinâmica complexa, metabolicamente ativa, sendo responsável por diversos processos metabólicos únicos não realizados pelo hospedeiro humano, mas que são cruciais para a sua fisiologia. Através da produção/fermentação de metabólitos, a microbiota intestinal modula as vias de sinalização envolvidas na homeostase da mucosa intestinal. A quebra do equilíbrio entre o trato gastrointestinal e a microbiota residente está na base do desenvolvimento de doenças intestinais e extraintestinais, como alergia, doença inflamatória intestinal (DII), obesidade, câncer, diabetes, distúrbios metabólicos, dislipidemia cardiovascular e neuropatologia (Chen *et al.*, 2018). Algumas das espécies pertencentes à microbiota intestinal secretam compostos inibitórios, como bacteriocinas, lantibióticos² e colicinas que impedem o crescimento de patógenos invasores (Stecher; Berry; Loy, 2013; Wotzka; Nguyen; Hardt, 2017). Em termos gerais, as principais classes de metabólitos conhecidos, produzidos ou transformados pela microbiota intestinal, com efeitos na fisiologia ou colonização por patógenos, incluem ácidos orgânicos (lactato, succinato e formiato, etc), ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato, etc) (Wotzka; Nguyen; Hardt, 2017), lipídios (ceramidas, lisofosfatidilcolinas, fosfatidilcolinas, etc), ácidos graxos de cadeia ramificada (valerato, isobutirato, isovalerato,

²Classe de antibióticos peptídicos policíclicos que contêm os aminoácidos tioésteres lantionina ou metilantionina, bem como os aminoácidos insaturados dehidroalanina e o ácido 2-aminoisobutírico. São produzidos por muitas bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus* e *Streptomyces*. Fazem parte de uma classe de bacteriocinas também chamadas de bacteriocinas Classe I (Stecher; Berry; Loy, 2013).

etc), aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina, valina), vitaminas (biotina, folato, niocina, etc), ácidos biliares (ácido desoxicólico, ácido litocólico, etc) e neurotransmissores (serotonina, etc) (Turroni *et al.*, 2016).

Como já foi dito anteriormente, a estimativa do número de genes da microbiota intestinal é 150 vezes maior do que o número de genes no genoma humano. Portanto, a capacidade metabólica da microbiota intestinal excede em muito a capacidade metabólica das células humanas (Cani *et al.*, 2019; Rajakovich; Balskus, 2019). Consequentemente, os microrganismos da microbiota intestinal produzem um vasto conjunto de pequenas moléculas que são quimicamente distintas daquelas geradas pelo metabolismo do hospedeiro (Rajakovich; Balskus, 2019). A quantidade de pequenas moléculas produzidas no trato gastrointestinal, como resultado da rede interativa de comunicação química entre o hospedeiro e sua microbiota residente é imensurável (Cani *et al.*, 2019). A natureza e a abundância desses metabólitos podem variar substancialmente entre indivíduos, dependendo da composição da microbiota intestinal e da ingestão alimentar, entre outros fatores (Rajakovich; Balskus, 2019). Muitos desses metabólitos desempenham papéis biológicos críticos não confinados ao intestino, mas conectados fisiologicamente a órgãos distantes, incluindo o fígado, os músculos esqueléticos e o cérebro, que contribuem fortemente para o fenótipo metabólico do hospedeiro e, consequentemente, para o estado de saúde (Turroni *et al.*, 2016). Em muitos casos, os metabólitos produzidos pelo hospedeiro e pela microbiota intestinal são trocados e podem ter consequências únicas, tanto para o hospedeiro como para membros da microbiota (Rajakovich; Balskus, 2019), tendo em conta que a microbiota intestinal está envolvida na regulação de várias vias metabólicas do hospedeiro dando origem a eixos metabólicos, de sinalização e imunoinflamatórios interativos da microbiota hospedeira que conectam fisiologicamente o intestino, o fígado, os músculos e o cérebro (Nicholson *et al.*, 2012).

A abordagem de análise do metaboloma fecal para avaliar a saúde e a doença humana é particularmente atraente por vários motivos. A primeira é sua natureza não invasiva de amostragem e a sua ampla cobertura metabólica, que reflete uma série de processos biológicos. Além disso, esta abordagem leva em conta não só o metabolismo hospedeiro, mas também perfis e atividades da microbiota intestinal humana (Karu *et al.*, 2018). De fato, vários metabólitos celulares estão associados aos fenótipos de organismos vivos (humanos, camundongos, bactérias, etc.) e representam os substratos e produtos de diferentes vias bioquímicas que refletem fatores genéticos e ambientais (Kim *et al.*, 2016). O metaboloma alvo fornece informações quantitativas para uma lista predefinida de metabólitos ou vias metabólicas

de interesse, sendo útil para responder a quaisquer questões bioquímicas ou hipóteses específicas (Kim *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018).

1.1.3. Ácido 3,4-dimetilbenzóico.

Em estudos anteriores do nosso grupo, foi avaliada, a partir de um EF, a presença de metabólitos produzidos pela microbiota intestinal com potencial de regular ou influenciar de alguma forma processos importantes na virulência de *Salmonella*, como por exemplo, a invasão de células epiteliais. Após a purificação dos metabólitos bioativos, foram descritas as suas respectivas estruturas químicas e verificado se possuíam uma atividade semelhante ao EF. Dentre as moléculas selecionadas foi identificado o composto aromático ácido 3,4-DMB, que atua como um forte repressor da expressão do *hilA* e inibe a invasão das células epiteliais hospedeiras por parte de *Salmonella* (Peixoto *et al.*, 2017). Estudos avaliando o efeito desse metabólito no crescimento e regulação de fatores de virulência em bactérias é inexistente. Entretanto, Grazia Baggi e colaboradores (1996) demonstraram anteriormente as vias de oxidação e degradação do ácido 3,4-DMB para uso como fonte de carbono por *Pseudomonas putida* (Baggi; Bernasconi; Zangrossi, 1996).

1.1.4. *Clostridium citroniae*.

A espécie *C. citroniae* foi isolada, juntamente com *Clostridium aldenense*, de infecções clínicas humanas em 2006, por um grupo de pesquisadores do *R. M. Alden Research Laboratory*, (*UCLA School of Medicine*, EUA). Nesse estudo foi realizada uma identificação prévia de 108 isolados como *Clostridium clostridioforme*, baseado na morfologia colonial e celular, além de testes bioquímicos. Como estudos daquela época haviam indicado a existência de três espécies diferentes no grupo de *C. clostridioforme*: *Clostridium hathewayi*, *Clostridium bolteae* e *C. clostridioforme*, após novas análises das espécies isoladas usando testes bioquímicos, enzimáticos e métodos moleculares foi confirmada a presença das três espécies acima mencionadas (Warren *et al.*, 2006). Porém 22 cepas foram identificadas apenas ao nível

de gênero pelo sequenciamento do gene codificador do rRNA 16S e, embora fossem microscópica e morfológicamente indistinguíveis das outras três espécies, as semelhanças pelo sequenciamento genético eram de 96 e 98%. Além disso, estas cepas eram indol-positivas. Assim, foram propostas duas novas espécies para esses isolados, *C. aldenense* sp. nov e *C. citroniae* sp. nov.

C. citroniae colônias com 1 a 2 mm de diâmetro, achatadas e opacas a branco e não hemolíticas nas placas de *Brucella* ágar-sangue em 48 horas a 37 °C. As células são gram negativos e apresentam um tamanho de 0,8-1,1 µm de largura por 2-5 µm de comprimento. Os esporos são raramente vistos, como ocorre em outras espécies deste grupo, incluindo *C. aldenense* sp. nov. (Warren *et al.*, 2006).

C. citroniae produzem ácido a partir de glicose, maltose, manose, ramnose, sacarose, trealose e xilose, mas não a partir de celobiose, esculina, lactose, manitol, melezitose, rafinose, salicina, sorbitol ou amido. Não hidrolisam a ureia, a esculina, o amido ou a gelatina bem como não reduzem o nitrato. Apresentam perfil de fermentações de arabinose variáveis. A fosfatase alcalina é positiva, mas a arginina di-hidrolase, a-galactosidase, galatosidade, a-glucosidade, a-arabinosidase, a glucuronidase, a N-acetil-glucosaminidase arilamidase, pró-arilamidase, leucilglicina arilamidase, fenulalanina arilamidase, leucina arilamidase, arilamidase do ácido piroglutâmico, tirosina arilamidase, alanina arilamidase e glicina arilamidase são negativas (Warren *et al.*, 2006)..

Essas duas novas espécies foram diferenciadas das outras espécies anteriores, pelos resultados da fermentação da rafinose, ramnose alfa-galactosidase e beta-galactosidase: positivo, negativo, positivo e positivo respectivamente, comparado com as espécies anteriores que são: negativo, positivo, negativo e negativo, respectivamente (Warren *et al.*, 2006).

Após a determinação de que um EF humano exercia forte repressão da expressão de *hila* por *Salmonella*, diversos membros do microbioma intestinal humano foram cultivados, e extratos de culturas puras foram testados contra *Salmonella* (Antunes *et al.*, 2014). Isto foi feito com o intuito de identificar membros da microbiota intestinal que apresentassem a mesma atividade biológica presentes no EF (modulação da expressão gênica e alteração na capacidade de *Salmonella* de invadir células epiteliais). Nesse estudo, foi verificado que ECP de *C. citroniae* apresentava efeito repressor em *hila* de forma semelhante ao EF (Antunes *et al.*, 2014). Assim, o presente estudo envolveu a testagem do efeito desse ECP de *C. citroniae* na expressão de genes de quinases sensoras de TCS de *Salmonella*, bem como o seu efeito na capacidade do patógeno de sobreviver no interior de macrófagos.

1.2. Biologia de *Salmonella*.

O gênero *Salmonella* pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Fazem parte deste gênero bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas, que não formam esporos, possuem forma de bastão, medindo entre 2 e 3 μm de comprimento por 0,4 a 0,6 μm de largura e se movem por meio de flagelos peritríquios. O gênero *Salmonella* é formado por duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Ambas podem infectar os humanos; porém, membros da espécie *S. enterica* infectam primariamente animais domésticos e selvagens, como bovinos, aves, anfíbios, répteis e moscas (Ramos-Morales, 2012; Fàbrega; Vila, 2013; Larock; Chaudhary; Miller, 2015). A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) e *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (Fàbrega; Vila, 2013; Lamas *et al.*, 2018). A espécie *S. bongori* (V), que inicialmente era considerada outra subespécie da espécie *S. enterica*, é agora classificada separadamente das restantes linhagens de *S. enterica*, como uma espécie distinta. *S. bongori*, bem como as subespécies II, IIIa, IIIb, IV e VI raramente são isoladas de espécimes clínicos, e são encontradas principalmente em vertebrados de sangue frio e no meio ambiente. Dessa forma, a grande maioria de *Salmonella* spp. que causam doenças em humanos e animais domésticos pertencem a espécie *S. enterica* e a subespécie *enterica* (I) (Grimont e Weill. 2007; Fàbrega; Vila, 2013; Lamas *et al.*, 2018).

As cepas *S. enterica* podem ser alternativamente classificadas com base no antígeno de superfície O (lipopolissacarídeo, LPS) em 67 sorogrupos. Ainda, podem ser classificadas em 2649 sorotipos ou sorovares quando as cepas são diferenciadas por seus antígenos flagelares (O e H). Dentre esses sorovares, 1531 são reconhecidos como pertencendo a *S. enterica* subsp. *enterica* (I) (Fàbrega; Vila, 2013; Pulido-Landínez, 2019). Os sorovares mais conhecidos e estudados são: Typhi, Paratyphi, Enteritidis, Typhimurium e Cholerasuis. Estes são caracterizados por três antígenos de superfície: antígeno flagelar “H”, antígeno “O” e o antígeno de polissacarídeo “Vi” (encontrados nos sorovares Typhi e Paratyphi) e lipopolissacarídeos (LPS) (Coburn; Grassl; Finlay, 2007; Lamas *et al.*, 2018). Os sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* que mais comumente causam doenças gastrointestinais são chamados de não-tifóides. Alguns sorovares que rotineiramente causam doença grave e sistêmicas em humanos são chamadas de sorovares tifóides, sendo os mais comuns os sorovares Typhi e Paratyphi. Entretanto, mesmo os sorovares não-tifóides podem causar doenças sistêmicas graves,

especialmente em pacientes imunocomprometidos (Fàbrega; Vila, 2013; Larock; Chaudhary; Miller, 2015).

No nosso estudo, utilizamos a *S. enterica* sorovar Typhimurium (cepa SL1344), um dos principais agentes etiológicos de infecções gastrointestinais de origem bacteriana. Para fins de facilidade, nos referiremos a este sorovar apenas como *Salmonella* neste documento. Para colonizar o trato gastrointestinal e estabelecer infecção, *Salmonella* compete com os membros da microbiota intestinal por nutrientes, espaço e supera a resistência à colonização (Lawley; Walker, 2013).

Para conseguir chegar ao intestino, colonizar e causar infecção, *Salmonella* usa múltiplos mecanismos de defesa para resistir ao meio ambiente hostil encontrado ao longo do trato gastrointestinal. Quando as bactérias são ingeridas, através de água ou alimentos contaminados, o primeiro desafio a superar são as condições estressantes do pH ácido do estômago. Como *Salmonella* pode ser destruída no estômago, muitas bactérias devem ser ingeridas para que a infecção se desenvolva, a menos que a pessoa tenha uma deficiência de ácido estomacal. Essa deficiência pode ocorrer em: crianças menores de um ano de idade, pessoas mais velhas, pessoas tomando anti-ácidos ou drogas que inibem a produção de ácido estomacal (ex: bloqueadores da histamina-2, como a ranitidina, ou inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol). Nesse trânsito pelo estômago, grande parte das bactérias morrem sob o efeito do pH ácido; porém, em muitos casos um pequeno número dessas bactérias escapa e atinge o intestino (Gart *et al.*, 2016). A competição por nutrientes e por sítios de ligação, assim como diversos compostos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro e pela microbiota intestinal são alguns dos obstáculos que *Salmonella* enfrenta e precisa vencer para estabelecer um processo infeccioso com sucesso. Isto ocorre através da utilização de uma série de mecanismos de virulência, que lhe permitem, por exemplo, coordenar a expressão de genes de maneira vantajosa de modo a invadir o epitélio intestinal, além de sobreviver e se multiplicar em células fagocíticas (Gart *et al.*, 2016).

O cenário epidemiológico atual com relação às infecções gastrointestinais mostra que alguns fatores tornam infecções por *Salmonella* um importante problema de saúde pública. A não existência de vacinas eficazes, opções de tratamento limitadas e a aquisição e desenvolvimento de resistência a muitos antimicrobianos por parte da *Salmonella* tornam infecções por este patógeno um problema ainda mais grave (Anderson; Kendall, 2017). Infecções por *Salmonella* representam uma das quatro principais causas globais de doenças diarreicas. Tais doenças, transmitidas principalmente por alimentos e águas contaminados,

geralmente são autolimitantes, mas podem também ser fatais, especialmente para crianças com menos de cinco anos (Zaidi; Macías; Calva, 2006). A gravidade depende ainda de fatores do hospedeiro e do sorovar causador da infecção. A resistência a drogas em alguns sorovares constitui uma preocupação adicional no cenário de saúde pública global. Salmonelose continua sendo um problema de saúde pública global, causando significativa morbidade e mortalidade. Anualmente, 550 milhões de pessoas apresentam doença diarreica, incluindo 220 milhões de crianças menores de cinco anos, e a mortalidade anual é estimada em 350.000 (Besser, 2018). No homem, *Salmonella* causa principalmente dois tipos de doenças: uma variante bastante comum na forma de uma gastroenterite inflamatória, e uma forma grave denominada de febre tifoide ou paratifoide, que afeta anualmente 20 milhões de indivíduos (Besser, 2018).

Infecções por *Salmonella* levam ao desenvolvimento de uma doença diarreica autolimitante, cujo quadro pode evoluir para doenças sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, assim como um pequeno subconjunto de pacientes imunocompetentes (Gunn, 2011). Uma infecção sistêmica requer invasão bacteriana do epitélio intestinal, um processo que ocorre principalmente através das células M nas placas de Peyer (Teplitski; Goodier; Ahmer, 2003). A doença causada por *Salmonella* caracteriza-se por diarreia inflamatória com presença de neutrófilos nas amostras de fezes do paciente. Para quebrar a barreira epitelial e invadir células epiteliais, e conseqüentemente induzir a inflamação, *Salmonella* usa maquinarias genéticas sofisticadas, incluindo dois sistemas de secreção do tipo 3 (*Type-3 Secretion System* - T3SS), sistemas comuns em bactérias Gram-negativas e que funcionam como seringas que permitem ao patógeno injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células hospedeiras (Gunn, 2011). Após invadir células hospedeiras, *Salmonella* pode então se espalhar por células da lâmina própria, incluindo fagócitos profissionais residentes neste ambiente. Patógenos com estilo de vida intracelular dispõem de ferramentas poderosas que permitem adaptar-se à vida no interior de células hospedeiras, escapando de mecanismos de imunidade inata. Tal feito é alcançado também através de T3SS, que impede a fusão de lisossomos ao fagossomo no qual *Salmonella* se encontra. Ao formar e estabelecer um vacúolo intracelular derivado do hospedeiro e que funciona como um nicho favorável, *Salmonella* se protege de efeitos deletérios externos, e se multiplica com facilidade (Larock; Chaudhary; Miller, 2015).

Como mencionado anteriormente, a infecção por *Salmonella* ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados; entretanto, para que infecção seja estabelecida, *Salmonella* precisa ultrapassar diversas condições adversas até atingir o intestino. Para perceber essas

condições adversas, *Salmonella*, assim como muitas outras bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, detectam diferenças na concentração de pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas, assim como outros sinais, utilizando TCS (Ramos-Morales, 2012). Tais sistemas são utilizados como sensores do ambiente externo, que permitem a *Salmonella* e outras bactérias avaliar as condições do ambiente em que se encontram e regular sua expressão gênica de modo a maximizar as suas chances de sobrevivência, colonização e multiplicação. Dezenas de TCS já foram descritos em *Salmonella*; entretanto, alguns destes ainda carecem de estudos aprofundados para determinar os estímulos ambientais detectados e seu papel no estilo de vida do patógeno (Mitrophanov; Groisman; Mitrophanov, 2014). Muitos sistemas presentes em *Salmonella* já foram identificados e caracterizados em outras espécies de bactérias geneticamente próximas e, por falta de trabalhos com esses TCS específicos em *Salmonella*, as referências a esses TCS foram feitas baseadas em estudos em outras espécies de bactérias, como *Escherichia coli* (Ansaldi *et al.*, 2007; Bott, 1997; Yamamoto *et al.*, 2008; Freeman; Dorus; Waterfield, 2013; Carey *et al.*, 2018) e *Klebsiella pneumoniae* (Bott, 1997).

Nosso grupo e muitos outros vêm demonstrando ao longo dos últimos anos que *Salmonella* possui uma relação íntima com a microbiota intestinal humana (Sekirov *et al.*, 2010; Thiennimitr *et al.*, 2011; Mitrophanov; Groisman; Mitrophanov, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a microbiota intestinal está envolvida na produção de milhares de compostos químicos presentes no trato gastrointestinal de mamíferos (Antunes *et al.*, 2011), e que alguns destes compostos possuem atividade biológica, atuando na regulação de genes de virulência de *Salmonella* (Antunes *et al.*, 2011; Peixoto *et al.*, 2017). Em particular, nossos estudos revelaram que a expressão de genes de virulência em *Salmonella* é controlada por pequenas moléculas aromáticas, como o ácido 3,4-DMB (Peixoto *et al.*, 2017). Entretanto, os mecanismos utilizados por *Salmonella* para detectar e responder a estas moléculas pequenas ainda permanece desconhecido. Assim, neste projeto propusemos investigar os possíveis mecanismos através dos quais *Salmonella* interage com a microbiota intestinal por sinalização química. TCS são candidatos naturais para tais mecanismos, já que constituem ferramentas amplamente utilizadas por bactérias para perceber as condições ambientais que as rodeiam. As diversas moléculas produzidas pela microbiota intestinal são detectadas pelos TCS de *Salmonella*? Como isto ocorre? Tais perguntas foram os norteadores de nossos esforços para entender de que forma o metaboloma intestinal humano modula a virulência deste importante patógeno humano.

1.2.1. Patogenicidade e fatores de virulência de *Salmonella*.

Salmonella tem a capacidade de reconhecer, adaptar e sobreviver dentro do trato gastrointestinal, assim como no interior de células fagocíticas durante a infecção. No processo de estabelecimento da infecção nas células do epitélio intestinal e nos macrófagos, *Salmonella* enfrenta obstáculos muito diferentes e, por conseguinte, utiliza diversas estratégias para superá-los (Anderson; Kendall, 2017).

Os membros da microbiota intestinal mantêm uma complexa rede de interações entre si, com células hospedeiras e com patógenos, que a tempo todo desafiam a microbiota de modo a estabelecer um processo infeccioso. Na maioria das vezes a microbiota consegue manter um equilíbrio nesse complexo ecossistema, resistindo a invasões (Alegre; Mannon; Mannon, 2014). Essas complexas redes de interações têm profundos impactos no equilíbrio entre os membros da microbiota, na homeostase do hospedeiro e no combate representado pelo processo infeccioso. A microbiota intestinal é sem dúvida um dos grandes obstáculos ao estabelecimento da infecção por *Salmonella*; porém, este patógeno desenvolveu, ao longo de sua evolução, uma variedade de mecanismos para superar muitas destas barreiras, e possui um arsenal próprio para invadir a camada epitelial intestinal não fagocítica e se espalhar em fagócitos profissionais como macrófagos, explorando as defesas do hospedeiro para seu próprio benefício (Gunn, 2011).

Estudos filogenéticos demonstraram que *Salmonella* e *E. coli* divergiram de um ancestral comum há cerca de 120-150 milhões de anos. Um fator chave nesta divergência entre esses microrganismos foi a aquisição das ilhas de patogenicidade pelo gênero *Salmonella* (Lamas *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018). As ilhas de patogenicidade representam regiões no cromossomo que carregam genes relacionados à virulência bacteriana; tais regiões são adquiridas horizontalmente, e presentes em *Salmonella* e muitos outros gêneros bacterianos. Em *Salmonella*, estes *loci* de patogenicidade são conhecidos como Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (*Salmonella Pathogenicity Islands* - SPIs) e são altamente conservadas. Até o momento, mais de uma dezena de SPIs foram identificadas em *Salmonella*, estando cinco delas (SPI-1 a SPI-5) claramente envolvidas na virulência de *Salmonella*, juntamente com outros fatores de virulência, como o operon *spv* do plasmídeo pSLT, vários tipos de adesinas, flagelos e os fatores essenciais para a formação de biofilmes, constituindo um amplo arsenal de virulência (Fabrega; Vila, 2013; Lobato-Márquez *et al.*, 2016).

Com base na literatura, SPI-1 e SPI-2 são as SPIs mais importantes para o processo de invasão e estabelecimento do nicho intracelular nas células do hospedeiro. Ambas contêm genes que codificam T3SS (Hallstrom; McCormick, 2015). O tamanho do *locus* SPI-1 é de aproximadamente 40 Kb e o conteúdo GC é significativamente menor (45,77%) que o conteúdo médio de GC (52,2%) do genoma de *Salmonella*. O tamanho do *locus* SPI-2 também é de 40 Kb; porém, esta SPI é composta por duas regiões diferentes. A região maior, de aproximadamente 25 Kb e com conteúdo GC de 53,05%, presente apenas em *S. enterica*, está envolvida na patogênese sistêmica e codifica as proteínas do T3SS-2. A outra região, de menor tamanho, com aproximadamente 15 Kb e com conteúdo GC de 40,00%, foi detectada em *S. bongori* e codifica a tetrionato redutase (Ttr) envolvida na respiração anaeróbica (Papanikolaou N., *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2018; Sévellec Y., *et al.*, 2018).

A maquinaria do T3SS em si é altamente conservada, sendo constituído por mais de 20 proteínas, muitas das quais com homologia a proteínas envolvidas na exportação flagelar (Ramos-Morales, 2012). O T3SS provavelmente evoluiu a partir do corpo basal do flagelo bacteriano, e é composto por um motor, complexo de agulhas e um translocon (injetissoma), através dos quais as proteínas efetoras secretadas são injetadas diretamente no citoplasma das células hospedeiras. Esse sofisticado sistema permite uma interação íntima entre *Salmonella* e células hospedeiras, com contato direto entre as partes envolvidas. O T3SS manipula a bioquímica e a fisiologia das células hospedeiras durante o processo de infecção. Esta manipulação permite a remodelação estrutural da membrana celular, gerando a formação de projeções, ou *ruffles*, na membrana que resultam no englobamento da bactéria por uma célula não fagocítica, como uma célula epitelial por exemplo. Além disso, mecanismos semelhantes ocorrem quando *Salmonella* é fagocitada por um fagócito profissional, como um macrófago. Efeitores alteram o fagossomo, impedindo a fusão com lisossomos e formando uma estrutura chamada de *Salmonella-containing vacuole* (SCV), o que resulta em escape do sistema natural de maturação de fagossomos (Malik-Kale *et al.*, 2011; Hallstrom; McCormick, 2015;). O SCV tem pH ácido (~5,8) e baixas concentrações de Fe^{2+} e Mg^{2+} (Owen; Casanova, 2015). Estudos *in vitro* que mimetizam o ambiente vacuolar revelam que *Salmonella* possui uma rede de genes coordenadamente regulados para combater o ambiente intracelular hostil (Lee; Detweiler; Falkow, 2000). As proteínas efetoras secretadas pelos T3SS fornecem várias funções, tais como a promoção da entrada bacteriana, controle de respostas inflamatórias e a regulação da sobrevivência bacteriana no meio intracelular hospedeiro, modulando funções bioquímicas do hospedeiro, tais como a estrutura do citoesqueleto, morte celular programada, progressão do

ciclo celular, tráfego endocítico e expressão gênica (Malik-Kale *et al.*, 2011; Ramos-Morales, 2012; Hallstrom; McCormick, 2015).

O T3SS-1 codificado pela SPI-1 está associado à invasão de células epiteliais. Este sistema transfere um conjunto de proteínas efetoras, incluindo SipA, SipC, SipB/SigD, SopE, SopE2 e SptP, que modulam o citoesqueleto de actina de células hospedeiras para promover a internalização de *Salmonella* na célula não fagocítica, conduzindo assim à invasão (Fabrega; Vila, 2013; Perrett; Zhou, 2013). Além disso, tais efetores induzem a secreção de fluidos e desencadeiam liberação de citocinas que induzem a inflamação intestinal (Gart *et al.*, 2016). Como resultado desse processo inflamatório ocorre transmigração de neutrófilos para o lúmen intestinal e a subsequente liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Metabólitos intestinais, como tiosulfato, quando expostos a ROS são oxidados. No caso de tiosulfato, tetrionato é produzido, e esta molécula pode ser usada exclusivamente por *Salmonella* como aceptor de elétrons alternativo. Com isto, *Salmonella* tem vantagem em relação aos membros da microbiota, já que consegue usar diversos compostos resultantes do processo inflamatório como aceptores alternativos de elétrons, podendo então realizar respiração anaeróbica, energeticamente mais vantajosa que a fermentação realizada pela maioria dos anaeróbios obrigatórios da microbiota intestinal (Khan, 2014). Uma vez dentro do SCV, *Salmonella* pode persistir ou escapar do SCV para se replicar no citoplasma de macrófagos. Os genes codificados dentro do SPI-2 estão envolvidos na inibição da fusão do fagossomo-lisossomo, e interferem com a montagem do complexo NADPH oxidase na membrana fagossomal, evitando assim a produção de superóxido e permitindo que as bactérias sobrevivam dentro da célula, neste ambiente naturalmente microbicida (Uchiya *et al.*, 1999; Gart *et al.*, 2016). Em termos gerais, a SPI-2 abriga quatro tipos de genes que são importantes para a virulência: *ssa*, genes que codificam o aparelho do T3SS-2; *ssr*, codificando os reguladores deste sistema; *ssc*, codificando as chaperonas; e *sse*, codificando os efetores (Marcus *et al.*, 2000; Kuhle; Hensel, 2004).

Salmonella resiste ao pH ácido do ambiente estomacal. Para proteger-se contra o choque ácido severo, para tal, *Salmonella* ativa a resposta de tolerância ao ácido (RTA), que fornece uma função homeostática para manter o pH intracelular superior ao do ambiente extracelular (Fabrega; Vila, 2013). O pH é um fator importante quanto se estuda o processo de infecção por *Salmonella*. Estudo de análise do transcriptoma de *Salmonella* sob a RTA mostrou que grande número de genes (~47%) é diferencialmente expresso (mais ou menos de 1,5 vezes). A anotação funcional desses genes revelou que estavam associados a processos de regulação, metabolismo, transporte e ligação, patogênese e mobilidade. Ainda nesse estudo, a análise de nocaute de um

subconjunto desses genes diferencialmente regulados permitiu aos autores identificar proteínas que contribuem para a RTA e virulência da bactéria (Ryan *et al.*, 2015). Após sobreviver ao pH ácido estomacal, *Salmonella* atinge o intestino e atravessa a camada de muco intestinal, aderindo ao epitélio intestinal por meio de adesinas codificadas nas SPI-3 e SPI-4. Uma vez aderida, *Salmonella* expressa o complexo multiproteico do T3SS-1, localizado no SPI-1 (Bushra Ilyas, *et al.*, 2017; Lamas *et al.*, 2018), dando início ao processo de colonização descrito acima.

O T3SS-1 codificado pela SPI-1 está associado à invasão de células epiteliais. Este sistema transfere um conjunto de proteínas efetoras, incluindo SipA, SipC, SipB/SigD, SopE, SopE2 e SptP, que modulam o citoesqueleto de actina de células hospedeiras para promover a internalização de *Salmonella* na célula não fagocítica, conduzindo assim à invasão (Fabrega; Vila, 2013; Perrett; Zhou, 2013). Durante esse processo da invasão do epitélio intestinal por *Salmonella*, as proteínas efetoras induzem a secreção de flúidos e o sistema imunológico responde produzindo potentes citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-8 e IFN γ que induzem a inflamação intestinal (Gart *et al.*, 2016). Como resultado desse processo inflamatório ocorre transmigração de neutrófilos para o lúmen intestinal através das células M e a subsequente liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Metabólitos intestinais, como tiosulfato, quando expostos a ROS são oxidados (Winter *et al.*, 2011; Khan, 2014; Wotzka; Nguyen; Hardt, 2017). Nesse processo, as bactérias do cólon produzem grandes quantidades de sulfeto de hidrogênio (H₂S), um composto altamente tóxico. A mucosa cecal protege-se dos efeitos deletérios do H₂S, convertendo-o em tiosulfato (S₂O₃²⁻) que, por sua vez é oxidado para tetrionato pelo ROS, sendo usada exclusivamente por *Salmonella* comoceptor alternativo de elétrons (Winter *et al.*, 2011; Khan, 2014; Wotzka; Nguyen; Hardt, 2017). Com isto, *Salmonella* tem vantagem em relação aos membros da microbiota, já que consegue usar diversos compostos resultantes do processo inflamatório como aceptores alternativos de elétrons, podendo então realizar respiração anaeróbica, energeticamente mais vantajosa que a fermentação realizada pela maioria dos anaeróbios obrigatórios da microbiota intestinal (Khan, 2014). Outro papel importante do processo inflamatório está relacionado com a hipóxia do tecido mucoso. Esse dano na mucosa intestinal facilita o aumento de níveis de oxigênio no lúmen intestinal, oriundos do sangue e de hemoglobina, e isso favorece ainda mais o crescimento de anaeróbios facultativos, que vão se sobrepondo em abundância em relação aos anaeróbios obrigatórios que constituem as maiores populações da microbiota intestinal, desencadeando o processo de disbiose (Stecher, 2015). Além de estarem envolvidas no processo

de oxidação de tiosulfato, as ROS resultantes do processo inflamatório inibem o crescimento de bactérias comensais altamente sensíveis ao oxigênio, na chamada hipótese do oxigênio³ (Rigottier-Gois, 2013; Stecher, 2015).

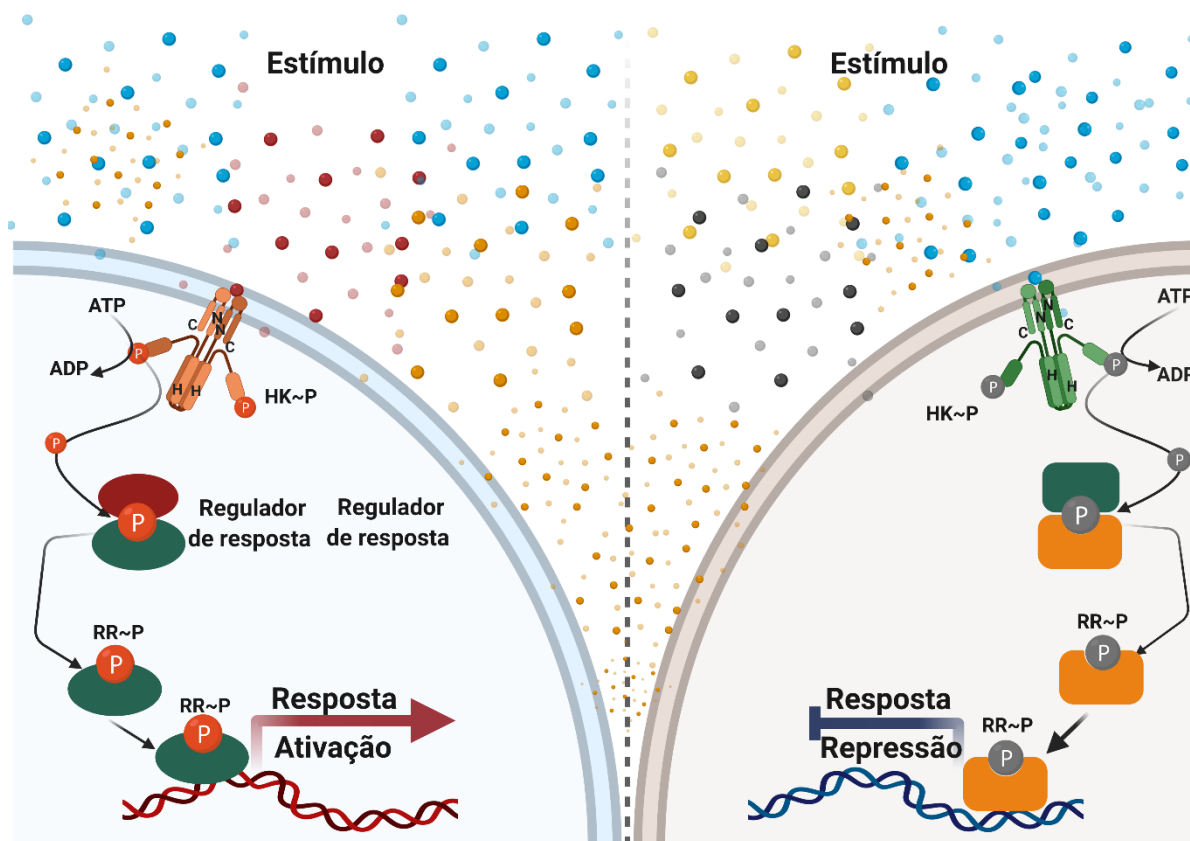
Dentro do citoplasma da célula hospedeira, *Salmonella* é envolvida pelo SCV, onde expressa os genes do T3SS-2, localizado na SPI-2. No decurso da maturação do SCV, *Salmonella* induz a formação de uma malha fina em torno dos vacúolos bacterianos, processo denominado polimerização de actina associado a vacúolo (VAP), e que é importante para a manutenção da integridade da membrana do vacúolo (Méresse *et al.*, 2001). O SCV maduro migra para perto do aparelho de Golgi, provavelmente para facilitar o acesso a vesículas de transporte endocítico e exocítico para obter nutrientes. Este evento é essencial para a replicação de *Salmonella* (Fabrega; Vila, 2013). Quando *Salmonella* cruza o epitélio intestinal, é fagocitada por três tipos de células fagocíticas reconhecidas por interagir com essas células bacterianas invasoras: (i) neutrófilos, (ii) monócitos inflamatórios que se diferenciam em macrófagos, e (iii) células dendríticas. Os neutrófilos e macrófagos são recrutados do sangue em resposta às citocinas pró-inflamatórias produzidas por outro tipo de monócitos que funcionam como células apresentadoras de antígeno (Fabrega; Vila, 2013). *Salmonella* sobrevive e se replica dentro do SCV, e a disseminação sistêmica da bactéria no hospedeiro é facilitada pela migração dos macrófagos através da corrente sanguínea, atingindo vários órgãos, como o baço e o fígado, onde preferencialmente se replicam (Fabrega; Vila, 2013; Hallstrom; McCormick, 2015; Lamas *et al.*, 2018). Os genes codificados dentro do SPI-2 estão envolvidos na inibição da fusão do fagossomo-lisossomo, e interferem com a montagem do complexo NADPH oxidase na membrana fagossomal, evitando assim a produção de superóxido e permitindo que as bactérias sobrevivam dentro da célula, neste ambiente naturalmente microbicida (Uchiya *et al.*, 1999; Gart *et al.*, 2016). Em termos gerais, a SPI-2 abriga quatro tipos de genes que são importantes para a virulência: *ssa*, genes que codificam o aparelho do T3SS-2; *ssr*, codificando os reguladores deste sistema; *ssc*, codificando as chaperonas; e *sse*, codificando os efetores (Marcus *et al.*, 2000; Kuhle; Hensel, 2004).

³Hipótese que tenta explicar o papel do oxigênio na disbiose intestinal, característico de pacientes com doença inflamatória intestinal. Algumas observações estão na base dessa hipótese, como por exemplo a diminuição de filos anaeróbios obrigatórios (ex: Firmicutes) e o aumento de anaeróbios facultativos (ex: membros de *Enterobacteriaceae*). Essa mudança no perfil da microbiota intestinal de anaeróbios obrigatórios para anaeróbios facultativos sugere fortemente uma interrupção da anaerobiose que caracteriza o ambiente intestinal (Rigottier-Gois, 2013).

1.3. Sistemas regulatórios de dois componentes (TCS).

Outros determinantes essenciais para invasão de células epiteliais intestinais e para a sobrevivência no interior dos macrófagos por parte de *Salmonella* incluem os TCS. Vários desses sistemas já foram identificados e suas respectivas funções devidamente caracterizadas. Bactérias usam TCS para sentir e se adaptarem às constantes mudanças no seu ambiente externo e com isso poder sobreviver em condições de estresse (Hartman; Samuels; Karls, 2016; Tiwari *et al.*, 2017). Os TCS são abundantes em bactérias e ausentes em metazoários, tornando-os alvos atraentes para estudos de drogas antibacterianas (Capra; Laub, 2012). *Salmonella*, assim como outras bactérias, geralmente respondem a uma condição de estresse modulando a expressão de genes específicos para contornar e se adaptar a esta condição de estresse (Park; Groisman, 2014; Knodler; Elfenbein, 2019). Os TCS são complexos sistemas de sinalização usados pelas bactérias que, em geral, controlam as interações sociais e comportamentais com outros microrganismos bem como a resposta a múltiplas condições de estresse ambiental, detectando moléculas de *quorum sensing*, íons, peptídeos antimicrobianos e alterações nas condições físico-químicas causadas pelas proteínas da membrana conhecidas como quinases sensoras (Olivera; Ugalde; Martínez-Antonio, 2010). De modo geral, um TCS consiste em dois componentes conservados: uma proteína sensora, histidina quinase (HK), e um regulador de resposta (RR). A HK está vinculada à membrana, e é o componente que detecta o estímulo ambiental específico (domínio de entrada), podendo este estímulo ser representado por pequenas moléculas orgânicas ou íons inorgânicos (Mg^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+}). O outro componente do sistema é o RR, que medeia a resposta celular (domínio de saída), modulando a expressão diferencial dos genes alvos (Fabrega; Vila, 2013; Gao; Stock, 2017; Pursley *et al.*, 2016). Ao detectar seu sinal, a HK catalisa uma reação de autofosforilação no seu resíduo histidina, usando o ATP citoplasmático, criando um grupo fosforil de alta energia que é transferido para um resíduo aspartato do RR, induzindo uma mudança na sua conformação com consequente ativação para modular a expressão dos genes-alvo específicos. Geralmente essa modulação ocorre através da ligação à região promotora do gene-alvo, resultando na ativação ou repressão da expressão gênica (Gao; Stock, 2009; Pursley *et al.*, 2016). O funcionamento geral dos TCS é mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura e funcionamento feral dos sistemas de dois componentes.



Legenda: Estrutura geral e funcionamento dos sistemas de componentes. Os TCS são constituídos por duas proteínas, uma localizada na membrana (proteína sensora quinase) e outra no citoplasma (proteína reguladora de resposta) da célula bacteriana. A proteína HK sente o sinal das mudanças nas condições ambientais, ativa e se autofosforila no resíduo histidina quinase, usando ATP do ambiente citoplasmático, resultando na transferência de um grupo RR, levando a sua fosforilação no resíduo aspartato. Como resultado a proteína RR muda de conformação e se liga à região promotora que regula a expressão de um gene ou conjunto de genes que respondem ao estresse ambiental ativando (lado esquerdo) ou reprimindo (lado direito) suas expressões. Fonte: Ilustração montada no programa de ilustração científica BioRender (<https://biorender.com/>).

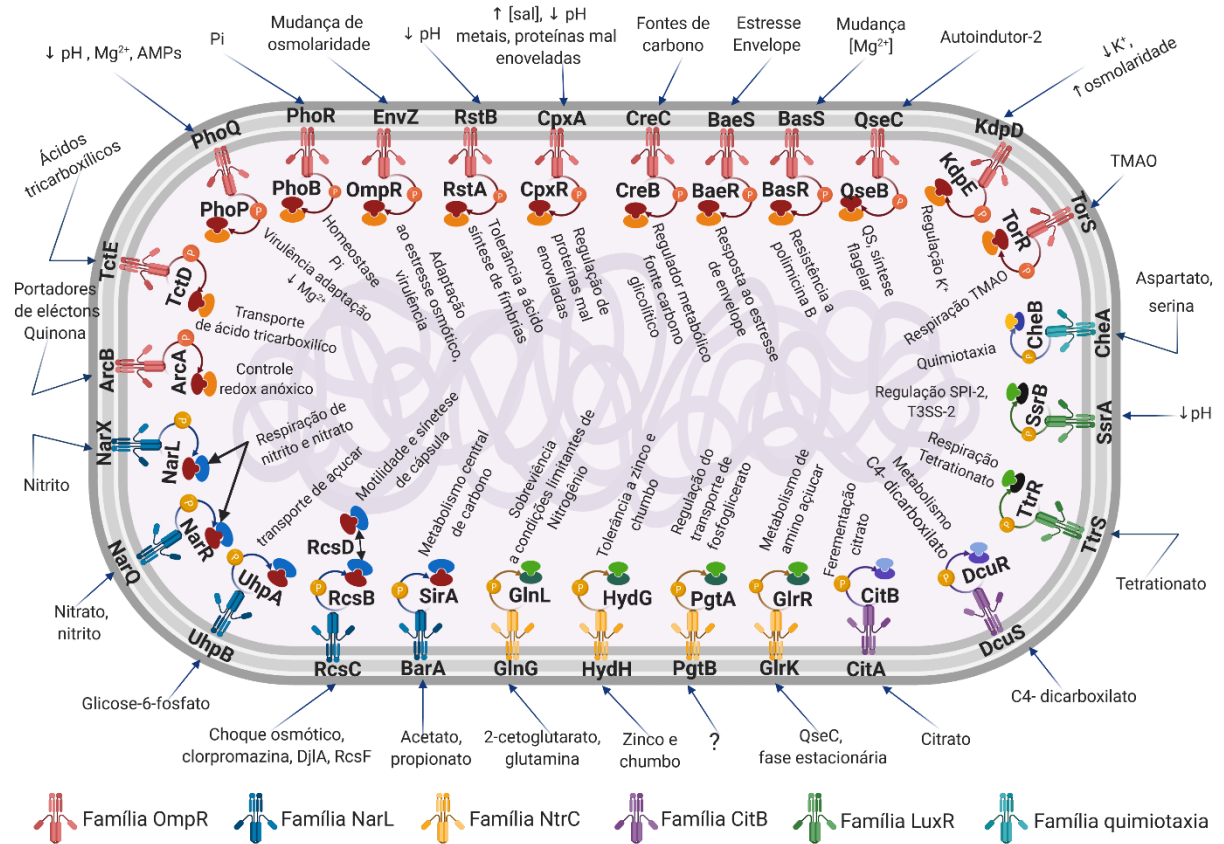
A maioria das espécies bacterianas contém mais de uma dezena de TCS que regulam uma grande variedade de comportamentos, incluindo processos críticos à sobrevivência em diferentes condições e ambientes, tais como metabolismo e mobilidade, respiração, tolerância a ácidos e a metais pesados, além dos processos especializados como virulência e desenvolvimento (Gao; Stock, 2017). Usando a *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG*, realizamos uma busca para todos os TCS de *Salmonella*, assim como seus respectivos estímulos e vias de sinalização e respostas geradas. Ao realizar essa pesquisa, verificamos um total de 27 TCS em *Salmonella*, organizados em seis famílias: I) Família OmpR, da qual fazem parte os TCS PhoQP, PhoRB, EnvZ-OmpR, RstAB, CpxAB, CreBC, BaeSR, BasSR, QseBC, KdpDE, TorSR, ArcAB e TctDE; II) Família NarL, da qual fazem parte os TCS NarXL, NarQP, UhpAB, RcsBCD e BarA-SirA; III) Família NtrC, da qual fazem parte os TCS GlnGL, HydHG,

PatAB e GlrKR; IV) Família LuxR, da qual fazem parte os TCS TtrSR e SsrAB; V) Família CitB, que inclui os TCS CitAB e DcuRS e VI) Família quimiotaxia, com um único TCS, CheAB. Um mapa representando resumidamente o estímulo principal e a resposta de cada TCS de *Salmonella* é apresentado na Figura 2.

Um mesmo TCS pode estar envolvido na regulação de vários processos, inclusive regulando ou modulando de alguma forma a expressão e atividade de outros TCS. Porém, cada um dos TCS tem uma função principal pela qual é reconhecido, e que pode ser a mesma função de outro TCS, mas envolvendo um mecanismo específico. Como forma de facilitar a discussão dos resultados, optamos por fazer uma organização dos TCS nesse trabalho, tendo por base as funções desempenhadas por cada um deles. Assim, TCS foram divididos em grupos segundo a sua função: a) Invasão e sobrevivência em células hospedeiras, PhoPQ, EnvZ-OmpR, RstAB, RcsBCD, BarA-SirA e SsrAB; b) Respiração, TorSR, TtrSR, NarXL, NarQP e ArcAB; c) Processos metabólicos, DcuSR, CitAB, GlrKR/QseFE, CreCB, PhoRB e GlnLG; d) Transporte, TctED, UhpAB, PgtAB e KdpDE; e) Tolerância a metais pesados e antimicrobianos, BasSR, BaeSR e HydHG e, f) Quimiotaxia e *Quorum sensing*, CheAB e QseCB. Os estímulos, resposta/função e referências para cada um desses TCS encontram-se na Tabela 1.

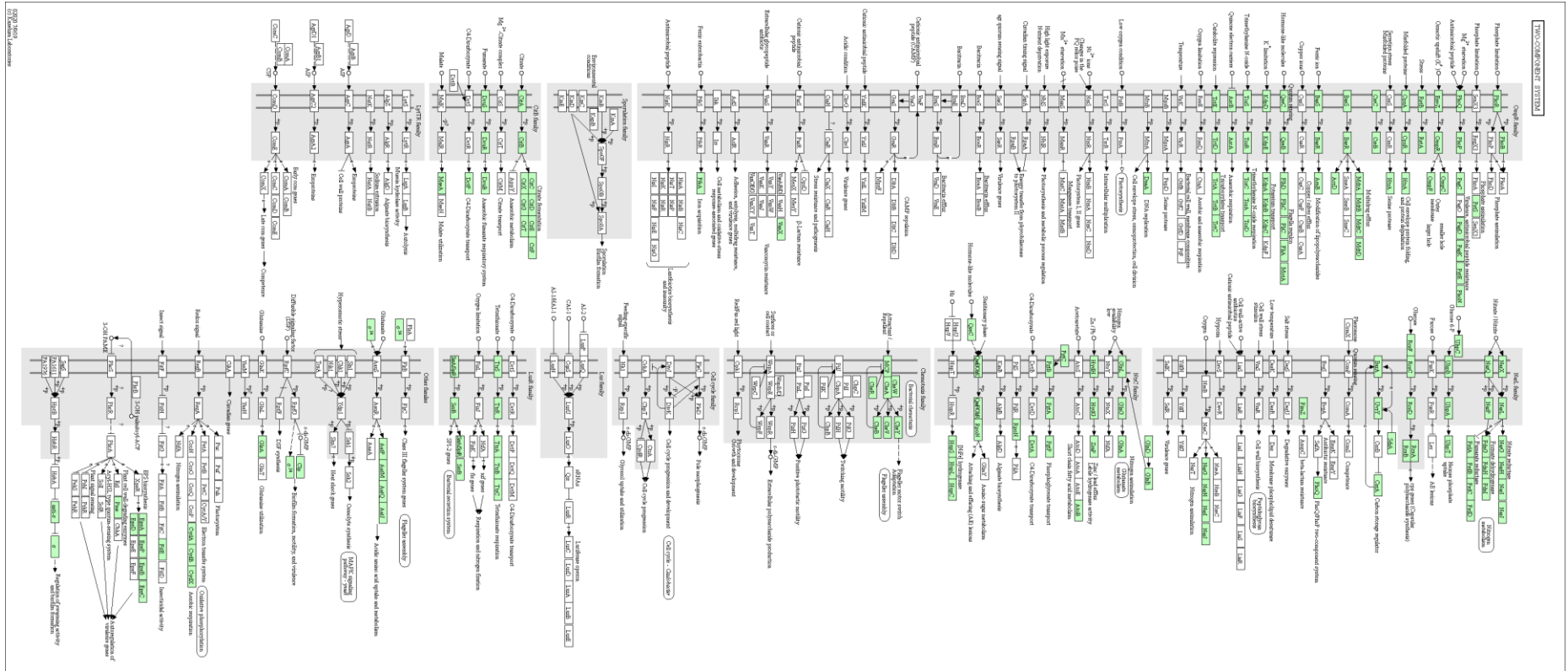
Como já foi descrito no parágrafo anterior, um total de 27 TCS já foram descritos em *Salmonella* e, baseados nas informações disponíveis na literatura e na base de dados *KEGG* referente à estrutura dos TCS que engloba a proteína HK e respectiva proteína RR de cada TCS, bem como os estímulos responsáveis pela ativação do HK e respectivas respostas ao estímulo recebido, criamos uma figura (Figura 1) simples e didática com todos os TCS de *Salmonella* usando a ferramenta de ilustração científica BioRender (©BioRender 2018). Nessa figura mostramos os 27 TCS de *Salmonella* e agrupamos os TCS com diferentes cores que permitissem agrupar as seis famílias dos TCS de *Salmonella*: OmpR, NarL, NtrC, LuxR, CitB e CheA (quimiotaxia). À volta da célula bacteriana colocamos o (s) estímulo (s) responsável (eis) pela ativação e conseqüente autofosforilação de cada proteína HK do TCS e, no citoplasma da célula bacteriana mostramos a transferência do grupo fosfato da proteína HK para o respectivo RR, bem como a respostas a (s) respectiva (s) resposta (s) resultante (s) da modulação exercida pelo RR fosforilado sobre um gene ou um operon.

Figura 2 - Sistemas de dois componentes de *Salmonella*.



Legenda: Mudanças no ambiente externo estimulam proteínas quinase sensoras na membrana da bactéria, levando à autofosforilação. Um grupo fosforil, resultado do processo de fosforilação é transferido para o regulador de resposta cognato, localizada no citoplasma. Este, por sua vez, se liga ao promotor de gene ou genes específicos para responder ao estímulo recebido e se adaptar às condições do ambiente externo naquele momento. Fonte: Ilustração montada no programa de ilustração científica BioRender (<https://biorender.com/>).

Figura 3 - Mapa representativo dos TCS em *Salmonella*.



Legenda: Os TCS presentes em *Salmonella* estão representados na cor verde e estão agrupados em seis famílias (Família: OmpR, NarL, NtrC, CitB, LuxR e família de proteínas de quimiotaxia), cada uma com o sinal detectado por cada quinase sensora, o respectivo regulador de resposta e resposta gerada em função do sinal que serve de estímulo.

Fonte: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.

Tabela 1. Sistemas de dois componentes (TCS) em *Salmonella*.

Família	TCS (HK/RR)	Locus do alvo	Estímulo	Função	Referências
OmpR	ArcBA	SL1344_4525		Controle redox anóxico	Georgellis; Kwon; Lin, 2001
	BaeSR	SL1344_2107	Estresse do envelope	Resposta ao estresse do envelope (multirresistência a drogas)	Guerrero <i>et al.</i> , 2013; Cordeiro <i>et al.</i> , 2014;
	BasSR	SL1344_4228	Mudança em [Mg ²⁺]	Resistência à Polimixina B	Merighi <i>et al.</i> , 2006
	CreCB	SL1344_4516	Fontes de carbono	Regulação de fosfato, resposta à fonte de carbono glicolítico	Scholten; Tommassen, 1993; Godoy <i>et al.</i> , 2016
	CpxAR	SL1344_4007	pH alcalino, alto teor de sal, metais, proteínas mal dobradas	Regulação de fatores de dobramento (folding), proteases e estrutura superficial	Li <i>et al.</i> , 2018
	EnvZ-OmpR	SL1344_3468	Mudanças de osmolaridade	Resposta ao estresse osmótico (modulação de porinas da membrana externa)	Utsumi, 2008
	KdpDE	SL1344_0685	Limitação de K ⁺ , osmolaridade alta	Regulação de K ⁺	Freeman; Dorus; Waterfield, 2013
	PhoPQ	SL1344_1168	Mg ²⁺ , pH ligeiramente ácido e peptídeos antimicrobianos	Virulência, adaptação à limitação de Mg ²⁺	Groisman; Mouslim, 2006; Park; Groisman, 2014; Baxter; Jones, 2015
	PhoBR	SL1344_0393	Pi (estímulo negativo)	Homeostase do fosfato	Scholten; Tommassen, 1993; Chakraborty <i>et al.</i> , 2011
	QseBC	SL1344_3152*	Autoindutor-2	<i>Quorum sensing</i> , biossíntese flagelar	Curtis <i>et al.</i> , 2014
	TctED	SL1344_2768	Ácido tricarboxílico	Transporte de ácido tricarboxílico	Winnen; Hvorup; Saier, 2003
TorSR	SL1344_3792	Trimetilamina-N-óxido (TMAO)	Respiração de TMAO	Jourlin <i>et al.</i> , 1996; Bordi <i>et al.</i> , 2003	

	RstAB	SL1344_1402	pH ácido	Tolerância a acidez e síntese de fímbrias	Ellemeier, Slauch, 2003; Smith <i>et al.</i> , 2016)
NarL	BarA-SirA	SL1344_2939	Acetato, propionato	Metabolismo central de carbono (controle de carboidratos)	Binnenkade; Lassak; Thormann, 2011; Martinez; Leone; Chang, 2017
	NarXL	SL1344_1694	Nitrato	Expressão de genes envolvidos na respiração anaeróbica	Stewart, 2003; Stewart; Bledsoe, 2003
	NarQP	SL1344_2443	Nitrato e nitrito	Expressão de genes envolvidos na respiração anaeróbica	Stewart, 2003; Stewart; Bledsoe, 2003
	RcsC-RcsD-RcsB	SL1344_2240	Choque osmótico, clorpromazina e outros	Síntese de cápsula, mobilidade	Pescaretti <i>et al.</i> , 2013
	UhpBA	SL1344_3755	Glicose-6-fosfato	Transporte de açúcar	Island; Kadner, 1993
NtrC	GlnLG	SL1344_3953	2-cetoglutarato, glutamina	Sobrevivência em condições limitadas de nitrogênio	Pahel; Rothstein; Magasanik, 1982
	GlrKR/QseEF	SL1344_2526*		Metabolismo de açúcar amino	Reichenbach; Göpel; Görke, 2009
	HydHG	SL1344_4112	Zinco e chumbo	Resistência (tolerância) ao zinco e chumbo	Leonhartsberger <i>et al.</i> , 2001
	PgtBA	SL1344_2365		Regula o sistema de transporte de fosfoglicerato indutível	Niu; Jiang; Hong, 1995
	QseCB	SL1344_3152*	Autoindutor-2	<i>Quorum sensing</i> , biossíntese flagelar	Curtis <i>et al.</i> , 2014
LuxR	SsrAB	SL1344_1326	pH baixo	Regula a expressão de genes de SPI-2 e T3SS	Lee; Detweiler; Falkow, 2000; Feng <i>et al.</i> , 2003; Tomljenovic-Berube <i>et al.</i> , 2010; Desai <i>et al.</i> , 2016
	TtrSR	SL1344_1320	Tetrationato	Respiração do tetrionato	Hensel <i>et al.</i> , 1999
CitB	CitAB	SL1344_0054	Citrato	Fermentação de citrato	Yamamoto <i>et al.</i> , 2008

	DcuSR	SL1344_4241	C ₄ -dicarboxilatos (ex: fumarato)	Resposta aos C ₄ -dicarboxilatos (metabolismo de C ₄ -dicarboxilatos)	Janausch; Garcia-Moreno; Uden, 2002; Abo-Amer <i>et al.</i> , 2004
Quimiota xia	CheAB	SL1344_1856	Transporte de fosfoglicerato	Quimiotaxia	Niu; Jiang; Hong, 1995

*O TCS QseCB é encontrado tanto nas famílias de genes OmpR e NtrC. No primeiro caso o regulador de resposta cognato ao sensor QseC é QseB e está envolvido na regulação da expressão do regulon flagelar: *flhC*, *flhD*, *fliC*, *fliA* e *motA*, enquanto na família NtrC o regulador de resposta hipotético para o sensor hipotético YfhK (GlrK, SL1344_2526) é YfhA (GlrR SL1344_2524), estando envolvido na regulação do metabolismo de açúcar.

2. JUSTIFICATIVA

Os TCS são partes fundamentais da biologia de bactérias, tanto comensais quanto patogênicas. TCS permitem que bactérias sintam mudanças nas condições ambientais em que se encontram e regulem a expressão de genes específicos em resposta a estas condições, de modo a possibilitar sua adaptação e sobrevivência. Durante sua vida, *Salmonella* é exposta a ambientes diversos, muitos dos quais são estressantes para o patógeno. Porém, como resultado do processo evolutivo *Salmonella* está bem equipada por maquinarias genéticas sofisticadas que lhe permitem se adaptar e sobreviver na natureza e se associar a diversos animais, incluindo os seres humanos. Durante a infecção do hospedeiro humano, *Salmonella* é ingerida em alimento ou água contaminada, e deve ser capaz de transitar por todo o trato gastrointestinal. Em particular, *Salmonella* deve sobreviver às condições inóspitas do estômago humano e chegar ao intestino delgado, seu sítio de infecção. Além disso, *Salmonella* deve ser capaz de derrotar as barreiras impostas pelo hospedeiro, que vão desde fenômenos mecânicos, como o peristaltismo, até a produção de moléculas pequenas com atividade antibacteriana. Ainda, a grande comunidade microbiana representada pela microbiota intestinal, um dos maiores mecanismos de defesa contra patógenos invasores, deve ser neutralizada ou evitada para que o processo infeccioso se estabeleça. Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que a microbiota intestinal está envolvida na produção de milhares de moléculas pequenas e que *Salmonella* é capaz de sentir estas moléculas e regular sua expressão gênica de acordo com os sinais detectados (Antunes *et al.*, 2014; Peixoto *et al.*, 2017). Entretanto, o mecanismo usado por *Salmonella* para se comunicar com a microbiota através destas moléculas ainda é em grande parte desconhecido. Assim, o objetivo deste trabalho foi a realização de uma análise detalhada do papel dos TCS na biologia de *Salmonella*, com destaque para o possível papel destes sistemas de sinalização no processo de comunicação com a microbiota intestinal. Para isso, investigamos o possível efeito das diversas moléculas produzidas pela microbiota intestinal na expressão dos TCS de *Salmonella*. Especificamente, testamos o efeito dos metabólitos presentes no EF, bem como o composto aromático, ácido 3,4-DMB, isolado do EF que reproduziu alguns dos fenótipos produzidos pelo EF (Peixoto *et al.*, 2017). Ainda, testamos o efeito de ECP de *C. citroniae*, membro da microbiota intestinal que já mostrou ter um forte impacto na regulação de genes de virulência e na capacidade de invasão de células hospedeiras por *Salmonella* (Antunes *et al.*, 2014). Na avaliação dos efeitos dos metabólitos acima mencionados, usamos a análise da expressão de genes que codificam proteínas quinase sensoras

dos 27 TCS já identificados e descritos em *Salmonella*, por sequenciamento de RNA e por PCR em tempo real. Testamos também o efeito desses metabólitos na capacidade de *Salmonella* de sobreviver intracelularmente em macrófagos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Entender o efeito do metaboloma intestinal na interação entre *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium e seu hospedeiro em processos importantes como, comunicação e transdução de sinal (através do TCS), processo de invasão de células epiteliais e sobrevivência da bactéria no interior de células hospedeiras (macrófagos).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* no crescimento de *Salmonella* tanto em aerobiose como anaerobiose;
- Avaliar a expressão de genes que codificam proteínas quinase sensoras dos TCS de *Salmonella* na presença do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* tanto em aerobiose como em anaerobiose através do RT-PCR;
- Avaliar o efeito do EF (anaerobiose) e ácido 3,4-DMB (aerobiose e anaerobiose) na expressão gênica global de *Salmonella* através de sequenciamento de RNA mensageiro (RNAseq);
- Avaliar o impacto de EF, ECP de *C. citroniae* e ácido 3,4-DMB na sobrevivência e replicação de *Salmonella* em macrófagos;
- Comparar os dados de sequenciamento de RNA mensageiro obtidos com outros depositados em bancos de dados para avaliar a expressão gênica de *Salmonella* durante o processo infeccioso.

4. METODOLOGIA

4.1. Amostras bacterianas utilizadas.

Nesse estudo foi usada a cepa de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium SL1344. Um auxotrófico de histidina, gerado por Bruce Stocker usando a cepa ancestral ST4/74 isolado originalmente do intestino de um bezerro com Salmonelose (adaptado do <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000008962>). Esta cepa é intrinsecamente resistente à estreptomicina na concentração de 100 µg/mL. Estoques dessa cepa foram armazenados a -80 °C no Laboratório de Biologia de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As amostras são rotineiramente cultivadas em meio caldo Luria-Bertani (LB) contendo 1% de NaCl (Difco™ LB Broth, Miller, Luria-Bertani, BD-Interlab) e ao meio é adicionado estreptomicina (100 µg/mL).

Foi usada também a cepa de *Clostridium citroniae* FM-V5-E (Antunes *et al.*, 2014), para estudar o efeito dos seus metabólitos na expressão de genes do TCS de SL1344. A cepa FM-V5-E foi gentilmente cedida pela Dra. Emma Allen-Vercoe (*University of Guelph*, Canadá), e foi mantida em estoque a -80 °C. *C. citroniae* foi rotineiramente cultivado em placas com ágar BHI (*BD Difco™ Brain Heart Infusion Agar*), e incubado em jarra de anaerobiose em estufa a 37 °C por aproximadamente 48 horas.

4.2. Extração de metabólitos de fezes humanas.

Amostras de fezes foram obtidas de doadores saudáveis, e que relataram não ter recebido tratamento antibiótico nos três meses anteriores à data de coleta. Amostras de fezes frescas ou coletadas com 24 horas de antecedência e armazenadas a -20°C foram pesadas e transferidas para potes de vidro. A estes, foi adicionado acetato de etila (*Ethyl acetate, HPLC plus, for HPLC, GC on residue analysis, 99,9%; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri United States*), um solvente orgânico utilizado em estudos anteriores do nosso grupo (Antunes *et al.*, 2011), na razão 1:1 (peso/volume, m/v). Por exemplo, em 200 g de fezes eram adicionados 200 mL de acetato de etila. Amostras de fezes em acetato de etila foram incubadas à temperatura ambiente durante 18 horas em agitação permanente a 225 RPM, para permitir maior solubilização. Após o tempo de incubação, as amostras foram decantadas por 10 minutos

para a precipitação de partículas sólidas e a fase líquida foi coletada e transferida para um balão de vidro de fundo redondo. O solvente foi evaporado em um evaporador rotatório (Heidolph, Schwabach, Germany) e os extratos secos foram estocados a -20 °C até serem utilizados. Como controle, o mesmo volume de acetato de etila sem fezes foram evaporados. Extratos secos foram suspensos em meio caldo LB, no mesmo volume recuperado e evaporado durante a extração, de modo que a concentração relativa do mesmo fosse de 1X. Em seguida, meio contendo o extrato foi filtrado usando um filtro com tamanho de poro de 0,22 µm (Millipore), o pH foi ajustado para 7,4 (mesmo procedimento para o meio LB) e a solução filtrada novamente. O meio de cultura contendo o extrato suspenso foi armazenado a -20 °C até o uso.

4.3. Condições de cultivo.

Salmonella foi cultivada na presença de metabólitos presentes no EF e no ECP de *C. citroniae* bem como na presença do ácido 3,4-DNB tanto em aerobiose como em anaerobiose. Destacamos aqui que, o inóculo *Salmonella* (de um cultivo *overnight*) usado em todas as culturas feitas em aerobiose estava na diluição 1/200 enquanto para todas as culturas foi usada diluição 1/50, isso foi a diluição que permitiu ter uma DO que dê-se para extrair RNA em concentrações suficientes para os experimentos moleculares.

4.3.1. Cultura de *Salmonella* na presença de extrato fecal em aerobiose e anaerobiose.

Para a cultura em aerobiose foi realizado repique da cepa SL1344 do estoque para placa de petri contendo meio LB ágar e estreptomicina (100 µg/mL). A cultura foi incubada por aproximadamente 18 horas em estufa a 37 °C. Uma colônia isolada foi transferida para caldo LB contendo estreptomicina (100 µg/mL) e cultivada a 37°C em agitação (225 RPM) por aproximadamente 18 horas. O antibiótico foi usado para evitar contaminação das culturas de SL1344. Oito réplicas biológicas foram subcultivadas a partir da cultura *overnight* (diluição 1:200) em meio LB com ou sem EF (usando acetato de etila como controle). Neste experimento, o EF foi utilizado em uma concentração relativa de 1/2 (1 mL EF em 2 mL de LB). Culturas foram incubadas a 37 °C em agitação (225 RPM) por quatro horas, tempo para que fosse atingido o meio da fase logarítmica de crescimento. Após este período prosseguimos com a extração de RNA, como descrito no item 4.5.

Para cultura de SL1344 em anaerobiose, culturas puras de SL1344 foram inoculadas em caldo LB contendo EF (1/2) contendo estreptomicina (100 µg/mL). O inóculo e meio a ser inoculado foram incubados em câmara de anaerobiose (*Vinyl Anaerobic Chambers - Coy Laboratory Products*, San Martin, California)⁴ em anaerobiose por aproximadamente 18 horas, no sentido de se ter um inóculo que tenha crescido nessa condição. Já o meio foi deixado em anaerobiose para que fosse reduzido. Seis réplicas biológicas foram subcultivadas a partir da cultura overnight na proporção 1:150 no meio LB com ou sem EF (usando acetato de etila como controle). A cultura foi incubada na temperatura de 37 °C, sem agitação e as medições da densidade óptica, no comprimento de onda de 600 nm (medidas em espectrofotômetro Ultrospec 2000, Companhia, Cidade, País) foram realizadas em intervalos de uma hora, de modo a ter uma curva de crescimento durante quatro horas. Após quatro horas de incubação, 2 mL de cultura foram transferidos para tubos falcon de 15 mL e adicionou-se 2 mL de *RNA protect* (Qiagen, Hilden, Germany) a cada réplica e deixou-se incubar por 10 minutos a temperatura ambiente e misturando a cada dois minutos no vórtex. As culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 6700xg, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi usado para a extração de RNA.

4.3.2. Cultivo de *Salmonella* na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose.

Para o cultivo de SL1344 na presença de 3,4-DMB nas condições de aerobiose e anaerobiose, preparou-se meio de cultura caldo LB, aferiu-se e ajustou-se o pH para 7,4. Para a cultura em aerobiose, foi utilizado caldo LB contendo 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µM de ácido 3-4-DMB. Como a molécula foi solubilizada em DMSO, foi utilizado DMSO puro, na mesma proporção da molécula, como controle dos experimentos. O inóculo *overnight* foi inoculado no meio LB com adição de ácido 3,4-DMB ou DMSO (controle), na proporção 1:200. Ao terminar o tempo de incubação de quatro horas, foi medida a densidade óptica de cada réplica e foi usado um mL de cultura para extração de RNA. A diferença metodológica entre as culturas em aerobiose e anaerobiose, é que para o caso de anaerobiose os inóculos foram incubados na câmara de anaerobiose por 18 horas e o meio LB foi deixado em

⁴As câmaras anaeróbicas de vinil fornecem uma atmosfera anaeróbica estrita de 0-5 partes por milhão (ppm) usando um catalisador de paládio e mistura de gás hidrogênio de 5%. A câmara a vácuo (*vacuum airlock*) para serviço pesado permite a transferência de amostras sem alterações na atmosfera interna (<https://www.omixys.pl/coy-laboratory-products/vinyl-anaerobic-chambers>).

anaerobiose pelo mesmo período para reduzir. A densidade óptica foi medida a cada hora, com o objetivo de traçar a curva de crescimento da bactéria na presença de 3,4-DMB em anaerobiose.

4.3.3. Cultivo de *Salmonella* na presença de ECP de *C. citroniae*.

4.3.3.1. Obtenção de ECP de *C. citroniae*.

Para a obtenção de ECP (metabólitos) de *C. citroniae*, foi realizado um repique da cepa de *C. citroniae* do estoque para placa de petri com o meio BHI ágar, incubando em anaerobiose a 37 °C por aproximadamente 48 horas. Para a confirmação da espécie, fez-se uma análise por espectrometria de massas por MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (Bruker Ultraflex Maldi Tof/tof, Bruker Corporation, USA) de uma colônia da placa de petri. Após, preparou-se 600 mL de caldo BHI, que foram divididos em dois volumes iguais (300 mL foram inoculados com *C. citroniae* e 300 mL foram usados como controle, não inoculados) e mantidos na câmara de anaerobiose por aproximadamente 18 horas para reduzir. A partir de uma cultura overnight o caldo BHI foi inoculado com *C. citroniae* na proporção 1:50, e incubado por aproximadamente 18 horas a 37 °C.

Para extração de ECP de *C. citroniae*, adicionou-se 300 mL de acetato de etila a cada uma das garrafas (caldo BHI inoculado com *C. citroniae* e caldo BHI sem inóculo). As garrafas com a mistura (cultura em BHI e acetato de etila) foram incubadas por 20 minutos, chacoalhando a cada 10 minutos para misturar bem. Em seguida formaram-se duas fases, sendo a fase de cima, acetato de etila com os metabólitos, transferida para balões volumétricos de fundo redondo para posterior secagem em evaporador rotativo. Após secagem, o extrato foi suspenso em caldo LB, em volume igual ao que tinha sido recuperado no momento da extração (1:1, v/v).

4.3.3.2. Cultivo de *Salmonella* na presença de ECP de *C. citroniae* em aerobiose.

A partir de uma cultura de *Salmonella* incubada *overnight* a 37 °C foi feito um subcultivo, usando uma diluição de 1:200 (v/v) para inocular o ECP de *C. citroniae* suspensos

em meio LB (proporção 2:1, v/v) mais estreptomicina (100 µg/mL), e incubados em estufa a 37 °C até a o meio da fase exponencial de crescimento, fase em que a bactéria está no seu auge de multiplicação, metabolismo e expressão gênica. Foi medida a densidade óptica e prosseguiu-se para a extração de RNA.

4.3.3.3. Cultivo de *Salmonella* na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose.

Meio de cultura LB contendo o extrato de *C. citroniae* (2/1, v/v) mais estreptomicina (100 µg/mL) ou contendo apenas extrato do meio BHI (controle, 2/1, v/v) mais estreptomicina (100 µg/mL) foram incubados na câmara de anaerobiose por 18 horas para reduzir o meio. *Salmonella* cultivada em anaerobiose foi usada para inocular os tubos com os respectivos meios, na proporção de 1:50 e incubados por 4 horas em anaerobiose. Terminado o tempo de incubação, mediu-se a densidade óptica das amostras, e dois mL da cultura de cada tubo foram usados para extração de RNA. A esses volumes foram adicionados dois volumes de *RNA protect Bacterial Reagent* (Qiagen) para um volume de cultura e deixou-se incubar por 10 minutos misturando a cada dois minutos no vórtex (Agitador Vortex Multifuncional, Kasvi, Cidade, País). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 6700xg, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi usado para extração de RNA.

4.4. Curvas de crescimento de *Salmonella* na presença de EF, ECP de *C. citroniae* e ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose.

Para realizar as curvas em aerobiose, *Salmonella* foi inoculada em LB e incubada a 37 °C por aproximadamente 18 horas. Foram feitas diluições de EF e ECP de *C. citroniae*, previamente secados no evaporador rotativo, e suspensos em meio LB na proporção de um volume por dois volumes de LB (1/2, v/v). O ácido 3,4-DMB foi suspenso em LB a uma concentração final 100 µM, e foi usado o mesmo volume do DMSO nas culturas controle. Em todas as suspensões preparadas, foi adicionada 100 µg/mL de estreptomicina. Numa placa de cultura de células de 96 poços, foram feitas duas triplicatas de todas as suspensões acima descritas, e duas triplicatas só com o meio LB, controle do experimento. Na primeira triplicata, foram transferidos 180 µL de cada suspensão e na segunda 200 µL (respectivos brancos). Uma

diluição de 1:20 μL da cultura *overnight* foi feita em LB e 20 μL dessa diluição foi inoculada em cada um dos poços que continham 180 μL das suspensões acima descritas. A placa foi incubada no leitor de placas *SpectraMax M2^e* (Molecular Devices Corporation, California, USA) e a leitura das densidades ópticas foram feitas a cada hora, por um período de 24 horas. Ao final, os dados gerados foram exportados para o Excel (Microsoft, Washington, EUA) e analisados, e as representações gráficas e os respectivos testes estatísticos foram realizados usando o programa *GraphPad prism*, versão 8.0 (*GraphPad Software Inc.*, California, USA).

Para fazer a curva de *Salmonella* em anaerobiose, *Salmonella* foi incubada por aproximadamente 18 horas em anaerobiose a 37 °C. Todos os procedimentos de preparação das suspensões dos extratos e do ácido 3,4-DMB no meio LB foram iguais aos descritos anteriormente. As suspensões foram incubadas por aproximadamente 18 horas em anaerobiose para que os mesmos pudessem ser reduzidos. O procedimento de montagem da placa seguiu o mesmo protocolo descrito para a curva feita em aerobiose. A placa foi incubada no leitor de placas (*SpectroMax M2^e*) e a leitura das densidades ópticas foram feitas a cada uma hora, por um período de 24 horas. A aquisição dos dados foi feita usando o software *SoftMax[®] Pro 6* (Molecular Devices Corporation, California, USA). Ao final, os dados gerados foram exportados para o Excel (Microsoft), analisados e plotados para o *GraphPad prism*, versão 8.0 (*GraphPad Software Inc*) para as representações gráficas e respectivos testes estatísticos.

4.5. Extração de RNA para PCR em Tempo Real e sequenciamento de RNA.

Para extração do RNA de culturas de *Salmonella*, foram adicionados dois volumes (1 mL) de *RNA Protect Bacterial Reagent* (Qiagen) a 500 μL das culturas bacterianas. A solução foi homogeneizada no vórtex e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, com intervalos de homogeneização a cada dois minutos. As células bacterianas foram então sedimentadas por centrifugação (10 minutos a 6700 xg) e a extração de RNA foi realizada usando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Em seguida as amostras de RNA foram tratadas pelo processo de digestão por DNase em coluna (*TURBO DNA-free[™] Kit*, Ambion, Texas, USA). Tendo sido adicionado tampão, num volume correspondente a 1/9 do RNA eluído, estes foram misturados gentilmente e, incubados a 37 °C por uma hora. Em seguida foi adicionado o inativador de DNase, num volume correspondente a 20% do volume de RNA tratado. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e depois as amostras foram centrifugadas a 10000 xg , a

fase superior foi recuperada e transferida para novos tubos estéreis e armazenada a -80°C . Para assegurar que não havia contaminação por quantidades significativas do DNA genômico nas amostras de RNA, foi realizada uma PCR utilizando 100 ng de RNA e 1 ng de DNA genômico como controle. Foi feita eletroforese em gel de agarose (*UltraPureTM Agarose*, Invitrogen, California, USA) 2% coradas com *SYBER[®] Safe DNA gel stain*, Invitrogen) na proporção 1:10000 (v/v) em tampão TAE (1X). A presença de banda específica no controle de DNA e ausência nas reações que utilizaram RNA como molde confirmou a ausência de contaminação significativa por DNA genômico. Foi feita, também, eletroforese em gel de agarose, com amostras de RNA, no sentido de avaliar a qualidade e integridade delas. A reação de síntese de cDNA foi realizado utilizando o kit *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega) e 1 μg de RNA. As reações de PCR em tempo real (RT-PCR) foram realizadas utilizando o kit *QuantiNovaTM SYBR Green RT-PCR Kit* (Qiagen) e as placas foram corridas no equipamento *Applied Biosystems 7500 system* (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) da Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ. O volume e a concentração de cada componente da reação estão descritos na Tabela 2. As mediadas dos dados obtidos com as culturas do controle foram normalizados para 1 e os dados de cada amostra foram normalizados de acordo com o controle. Os primers para os genes HK estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2 - Configuração da reação de PCR em tempo real (RT-PCR).

Componentes da reação	Volume (placa de 96 poços)	Concentração final
<i>2x QuantiNova SYBR Green RT-PCR Master Mix</i>	10 µL	1 X
<i>QN ROX Reference Dye</i> (uso apenas no termociclador <i>Applied Biosystems</i>)*	0,1 µL	200 X
Primer forward (PFW)	0,5 µL	-
Primer reverse (PRV)	0,5 µL	-
RNase-Free Water	7,9 µL	-
cDNA	1 µL	≤200 ng por reacção
Volume total da reação	20 µL	

* Para ser usado como concentrado 20x para termocicladores com alto ROX (por exemplo, ABI PRISM 7000, *Applied Biosystems* 7300, 7900 e *StepOne Real-PCR Systems*) e como concentrado 200x para termocicladores com baixo ROX (ou seja, *Applied Biosystems* 7500, ViiA7 e sistemas de PCR em tempo real QuantStudio).

Fonte: *QuantiNova SYBR Green RT-PCR Handbook* 08/2015

Tabela 3 – Primers utilizados no estudo.

Sistema de dois componentes (TCS)	Quinase sensora	Senso	Antisenso
1. PhoQP	<i>phoQ</i>	5'CCGACCATGACGCTGATTTAC3'	5'GTGGCGTCTACGTTGGTTTC 3'
2. PhoRB	<i>phoR</i>	5'CGTGGTACTGACCACAGAAGAG3'	5'TGAAGCGGACGGGTGAAA3'
3. EnvZ-OmpR	<i>envZ</i>	5'TGGCTGTGCCCCAATATCT3'	5'CGGCATGTTCAAGATCCACTAAC3'
4. RstBA	<i>rstB</i>	5'GCCCGTTCCCTATCTATT TC3'	5'GCTTTGGCGAGGGTCATTTG3'
5. CpxAR	<i>cpxA</i>	5'CTTCATTGGTCAGGCGGATAAC3'	5'GGCCGGTCGAATCAAGTAAAG3'
6. CreCB	<i>creC</i>	5'GAATGCAGGCGCTGGTAGAA3'	5'GCCTCGCTAAGCTGCGTAAATA3'
7. BaeSR	<i>baeS</i>	5'GTTAGCCTGACGCTGCTAAT3'	5'GACGACGGACTCAATCTCAAG3'
8. BasSR	<i>basS</i>	5'CGTCTTGACCAGATGATGGATAG3'	5'CCCTGATGTAGTTGGGTGATG3'
9. QseCB	<i>qseC</i>	5'GGAAGGTTTCGACAATGGCTATC3'	5'ATCAGCCACGGCGTTAATTG3'
10. KdpDE	<i>kdpD</i>	5'CGCCTGATAACCGACCTTT3'	5'CACTACGCCAGCAAATAGA3'
11. TorSR	<i>torS</i>	5'AGTCAGCGTGGGCAAATAG3'	5'CCGAAATGGCGAGTCAATA3'
12. ArcBA	<i>arcB</i>	5'CGCAGGATGAGCAGGATAAA3'	5'GGCAGACTGGAAACGGTAATA3'
13. TetED	<i>tetE</i>	5'CTTTAGCGCCGATGCTTCTC3'	5'GAATGGTGTATCCAGCGTTAC3'
14. NarXL	<i>narX</i>	5'ACGCTGGTTGAACAGCTTAC3'	5'CAGTCACCTGCATCTTCATAC3'
15. NarQP	<i>narQ</i>	5'GGGCGGTATCGGCATATTTAC3'	5'GCTCATTGGGTAAGCTGGTATC3'
16. UhpBA	<i>uhpB</i>	5'GCAGAGCGGGCAAATTATC3'	5'CGGCTTTCCAGCTCCATTT3'
17. RcsCDB	<i>rcsC</i>	5'CACGTCGGATGTGATGAAAAGAG3'	5'CACAGTCTGAGTCGGCAAATAG3'
18. BarA-UvrY	<i>barA</i>	5'CTTCCACAGCCAGCCTAATC3'	5'GCTCAGTAGATCCAGGGTACAT3'
19. GlnLG	<i>glnL</i>	5'GCAATCCATTACCCAATCCT3'	5'CACCAGCGTCACTTCGTTATC3'
20. HydHG	<i>hydH</i>	5'CTGCGGCGATCTTCATTCTG3'	5'TCCGCATTCCCATACCTACTC3'
21. PgtBA	<i>pgtB</i>	5'CTTGAGGCGCAGTTAGGTAGTA3'	5'ACCAGTCGGGAACGGATAAA3'
22. GlrKR	<i>glrK</i>	5'CGTCTTGCCGGATGATAAGTTG3'	5'GCCTGCACCATTTCCGTATT3'
23. TtrSR	<i>ttrS</i>	5'GCCAGTGTGCCTGTTAGAAA3'	5'CCAGCAGCATGACCCAAATA3'
24. SsrAB	<i>ssrA</i>	5'TGGACCAGGCAATGCAAAC3'	5'TACCGCGTTCCCGAGTAAAT3'
25. DcuSR	<i>dcuS</i>	5'CCGTTATTCGCACCCAGAAA3'	5'GCCGGTGGTTCATCATAA3'
26. CitAB	<i>citA</i>	5'ATATATGGAGGCGCGCATAG3'	5'CGACGGAAACAATACCGATGAC3'
27. CheAB	<i>cheA</i>	5'CGACTTACAAGAGTCGGTGATG3'	5'CAGGATACGCTCACGGTTAAG3'

^aPrimers foram desenhados usando o software online OligoAnalyzer 3.1. (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) e sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Coralville, USA).

4.6. Comparação dos resultados de RNAseq com base de dados disponíveis.

Para a realização do sequenciamento do RNAm, amostras de RNA foram extraídas como descritas acima, foi quantificada as respectivas concentrações e em seguida foi avaliada a integridade delas, para saber se estavam em boa qualidade. As amostras foram enviadas para a Plataforma de sequenciamento de alto desempenho, do Instituto Osvlado Cruz, da Fundação Osvlado Cruz (IOC/Fiocruz). A integridade das amostras foi analisada usando o *Bioanalyzer* e de seguida foi preparada as bibliotecas e a sequenciamento foi feita usando o sequenciador NGS, Hiseq 2500 (Illumina).

Atualmente várias bases de dados de RNAseq disponibilizam seus dados analisados e brutos, que podem ser acessados por pesquisadores da área interessados, para fins de comparação com seus dados. Assim, os dados brutos dos trabalhos de Kroger *et al.* (2013) e

Canals *et al.* (2019) foram acessados no *Salmonella Compendium v1.0* (<http://bioinf.gen.tcd.ie/cgi-bin/salcom.pl? HL>) e *Salmonella Compendium v2.0* (<http://bioinf.gen.tcd.ie/cgi-bin/salcom v2.pl? HL>), respectivamente. Com base no perfil de expressão gênica de SL1344 crescida na presença do ácido 3,4-DMB, selecionamos os genes do SPI-2 que tiveram suas expressões ativadas ou reprimidas. Comparamos o perfil de expressão de cada gene com o respectivo perfil de expressão de cepas cultivadas em diversas condições de estresses. Selecionamos algumas condições de estresse cuja caracterização já é bem estabelecida na literatura por afetar a expressão de genes envolvidos na virulência, como são os casos dos genes codificados nas SPI- e SPI-2, bem como genes dos TCS que as regulam. As condições selecionadas desses dois artigos (Kroger *et al.*, 2013; Canals *et al.*, 2019) para comparação com os nossos resultados constam nos Anexos 1 e 2 respectivamente.

4.7. Ensaio de viabilidade RAW 264.7 na presença de EF, ECP de *C. citroniae* e ácido 3,4-DMB.

Macrófagos RAW 264.7 foram semeados (10^5 células) em placas de 96 poços (*JET BIOFIL*[®] Tissue Culture Plate, 96 Well, DKSH Australia Pty Ltd, Victoria, Austrália) em 200 μ L de meio de cultura e foram incubados por diferentes tempos até 24 horas. Foi usado o meio RPMI contendo suspensão de EF, ECP de *C. Citroniae* ou ácido 3,4-DMB nas seguintes proporções: a) meio RPMI como controle geral, acetato de etila previamente seco e suspenso em RPMI (1/2, v/v) (que nos dirá se o solvente usado para extração de extrato fecal não interfere na viabilidade) e EF previamente seco suspenso em RPMI (1/2, v/v); b) meio RPMI como controle geral, acetato de etila previamente seco suspenso em RPMI e ECP de *C. Citroniae* suspenso em RPMI (1/2, v/v); e c) meio RPMI como controle geral, DMSO (*Sigma Aldrich*) suspenso em meio RPMI e ácido 3,4-DMB (100 μ M) suspenso em meio RPMI.

Cepas bacterianas SL1344, mantidas em estoque congelados (a -80°C) em glicerol foram semeadas em placas de petri contendo ágar LB e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas a 37°C por aproximadamente 12 horas. Os macrófagos, linhagem RAW 264.7 foram obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro.

No dia seguinte foram preparadas três culturas diferentes, uma contendo LB, outra contendo acetato de etila previamente seco e suspenso em LB na proporção de um 1/2 (v/v), e EF previamente seco suspenso em LB na proporção de 1/2 (v/v). Ajustou-se o pH para 7,4

e a todos os tubos foi adicionada estreptomicina a 100 µg/mL. Uma diluição de 1:150 da cultura previamente realizada foi inoculada às três condições de cultura acima descritas e em seguida foram incubadas por quatro horas em constante agitação em um shaker (*NOVATECNICA, model number: NT145*, São Paulo, Brasil) a 275 rpm durante quatro horas a 37°C.

Terminado o tempo de incubação, a densidade óptica das culturas foi mensurada no espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm. Tendo em conta que uma cultura de SL1344 que esteja numa DO de 1, num comprimento de onda de 600 nm tem cerca de $1,3 \times 10^9$ células bacterianas (dados não publicados), foi calculado, baseado na DO das culturas, o número de células de bactérias de cada condição. Com isso foi determinado o volume de cada cultura necessária para inocular cada poço contendo 10^5 RAW 264.7 em 200 µL de RPMI.

Para cada uma das condições de ensaio descrita acima, fez-se o ensaio de viabilidade de RAW 264.7, infectando-as ou não com SL1344. O objetivo desse ensaio é saber como é a viabilidade dos macrófagos nessas condições, isto é, se a presença de extrato fecal afeta a sobrevivência dos macrófagos e, por outro lado, se há infecção dessas células na presença do extrato. Esses ensaios foram acompanhados por 24 horas em vários pontos ao longo do tempo.

Para cada condição testada foram usadas quatro réplicas em placas de 96 poços sendo que foram feitas avaliação em vários pontos do tempo até um período de 24 horas. O tempo de interação entre RAW 264.7 e SL1344 foi de 30 minutos, de acordo com referências de estudos prévios, e após esse tempo o meio foi trocado. O novo meio adicionado teve cada uma das condições acima descrita, e a estes foi adicionado o antibiótico gentamicina a 100 µg/mL. Após uma hora e 30 minutos trocou-se novamente o meio e adicionaram-se meios nas mesmas condições anteriores, entretanto com uma concentração menor de antibiótico (10 µg/mL). O objetivo de adicionar meios com antibiótico depois de 30 minutos de interação é de matar as bactérias que não foram fagocitados pelos macrófagos.

Após quatro horas de incubação foram adicionados 20 µL de MTT a cada poço, misturando bem, e incubando por pelo menos 3 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse tempo de incubação, todo o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µL de DMSO a cada poço e misturou-se bem pipetando. A leitura e quantificação do número de células RAW 264.7 viáveis, após interação ou não com SL1344 nas condições específicas anteriormente descritas, foram feitas usando o leitor de placas *SpectroMax M2^e* (Molecular Devices Corporation). Esses procedimentos foram efetuados para os restantes dos pontos do experimento.

4.8. Ensaio de sobrevivência de *Salmonella* em macrófagos RAW 264.7 na presença de EF.

As etapas de reativação de SL1344 armazenada no estoque, preparação de inóculo, preparação e ajuste do pH dos meios, preparação e reativação dos macrófagos, cálculo do volume de cultura a ser usado para o experimento de sobrevivência de *Salmonella* em cada tempo de interação e troca de meios foram realizadas seguindo os mesmos protocolos descritos na sessão 4.6.

Após quatro horas de incubação, coletou-se o sobrenadante da cultura para posterior análise da produção de citocinas. Cada poço foi lavado com 200 μ L de PBS (1X) estéril. A cada poço foi adicionado 250 μ L de solução de lise Triton X-100 1%, SDS 0,1 %. Em seguida fez-se diluições seriadas (1/10) do lisado e 50 μ L de cada diluição foram plaqueadas em duplicata em ágar LB contendo estreptomicina (100 μ g/mL) e incubados a 37°C. Depois de aproximadamente 18 horas de incubação contaram-se as unidades formadoras de colônias (UFC) para cada diluição.

Os procedimentos acima descritos foram realizados para os restantes pontos (6 horas, 8 horas, 12 horas e 24 horas) até um tempo de interação final de 24 horas. Os resultados dos diferentes pontos durante 24 horas de interação foram comparados com o intuito de saber como é a sobrevivência de *Salmonella* cultivada na presença ou não de EF, no interior de macrófagos.

4.9. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o *Software GraphPad prism* versão 8 (GraphPad Software Inc) e sendo realizado o teste estatístico teste *t* não pareado e com intervalos de confiança de 95%.

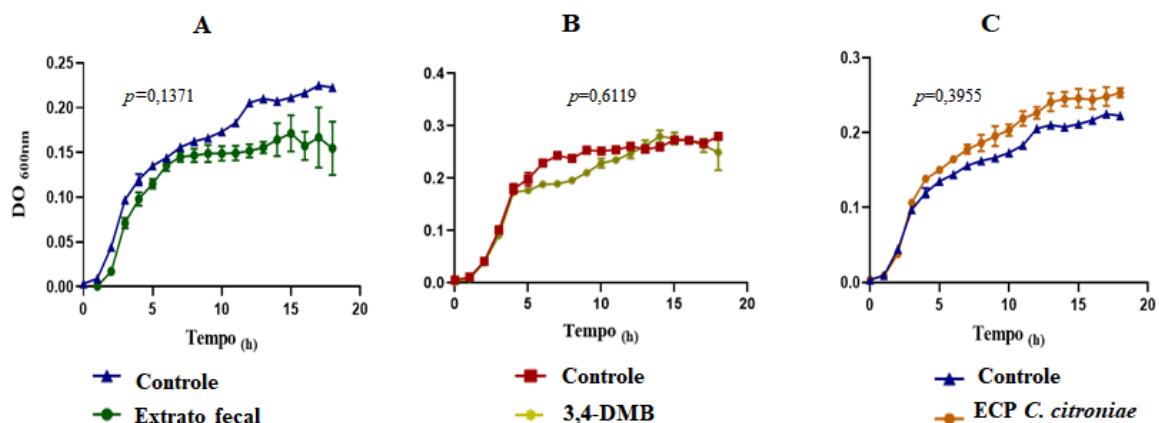
5. RESULTADOS

5.1. Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* no crescimento de *Salmonella* em aerobiose e anaerobiose.

Embora resultados anteriores do nosso grupo já tivessem mostrado os efeitos do EF (Antunes *et al.*, 2014) e do ácido 3,4-DMB (Peixoto *et al.*, 2017) no crescimento de *Salmonella* em aerobiose, os efeitos destes no crescimento desta bactéria em anaerobiose não haviam sido testados. Desta forma, realizamos curvas de crescimento de *Salmonella* na presença de EF, ECP de *C. citroniae* e na presença do ácido 3,4-DMB tanto em aerobiose como em anaerobiose.

Como mostra o gráfico da figura 4 que, a presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* não afetaram, de forma estatisticamente significativa, o crescimento de *Salmonella* em anaerobiose. Cada curva de crescimento foi comparada com o respectivo controle sendo que, a curva na presença de EF e ECP de *C. citroniae* foram comparadas com curva de crescimento de *Salmonella* cultivada na presença de acetato de etila. Já a curva de crescimento de *Salmonella* na presença do ácido 3,4-DMB foi comparada com curva de crescimento de *Salmonella* na presença do DMSO. Foi feito teste estatístico, *teste t*, cujos resultados mostraram não haver diferença estatisticamente significativo como mostram os valores do *p* valor: anaerobiose (figura 4) A) $p=0,1371$, B) $p=0,6119$ e C) $p=0,3955$.

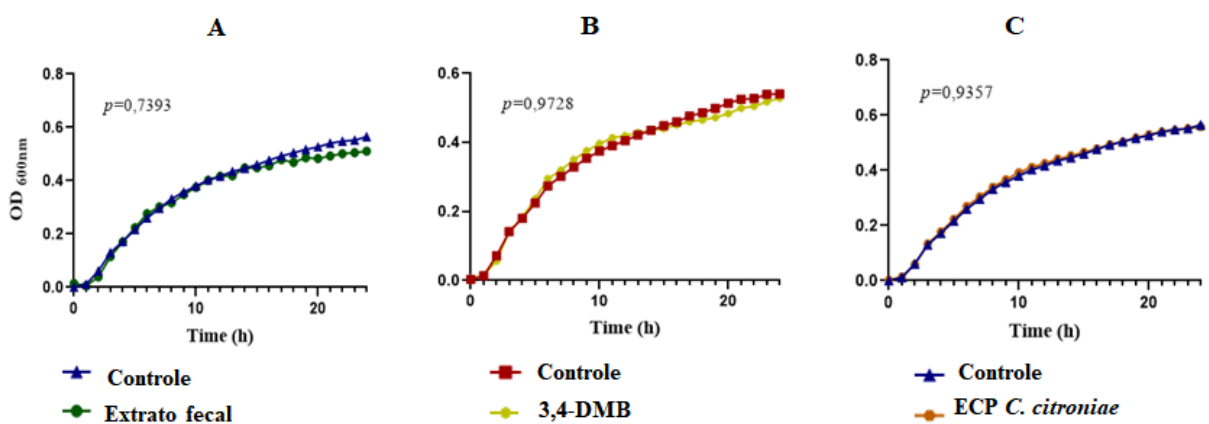
Figura 4 - Curva de crescimento de SL1344 em anaerobiose.



Legenda: *Salmonella* foi cultivada em anaerobiose na presença de EF (gráfico A, linha verde), ácido 3,4-DMB (gráfico B, linha amarelo escuro) e ECP de *C. citroniae* (gráfico C, linha laranja escuro). A linha azul corresponde ao controle (acetato de etila) e a linha vermelha controle (DMSO). $p=0,1371$ (controle acetato de etila vs. extrato fecal); $p=0,6119$ (DMSO vs ácido 3,4-DMB.) e $p=0,3955$ (controle acetato de etila vs. ECP de *C. citroniae*). Os testes de comparação das curvas de crescimento foram feitos ao final de 18 horas de incubação das culturas.

Assim como em anaerobiose, o crescimento de *Salmonella* em aerobiose na presença do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* suspensos em LB não tiveram diferenças estatisticamente significativas quando comparados com o respectivo controle. Foi realizado teste estatístico (teste *t*) e os valores de *p* foram os seguintes: A) $p=0,7393$, B) $p=0,9357$ e C) $p=0,9357$, como mostra a figura 5.

Figura 5 - Curva de crescimento de SL1344 em aerobiose.



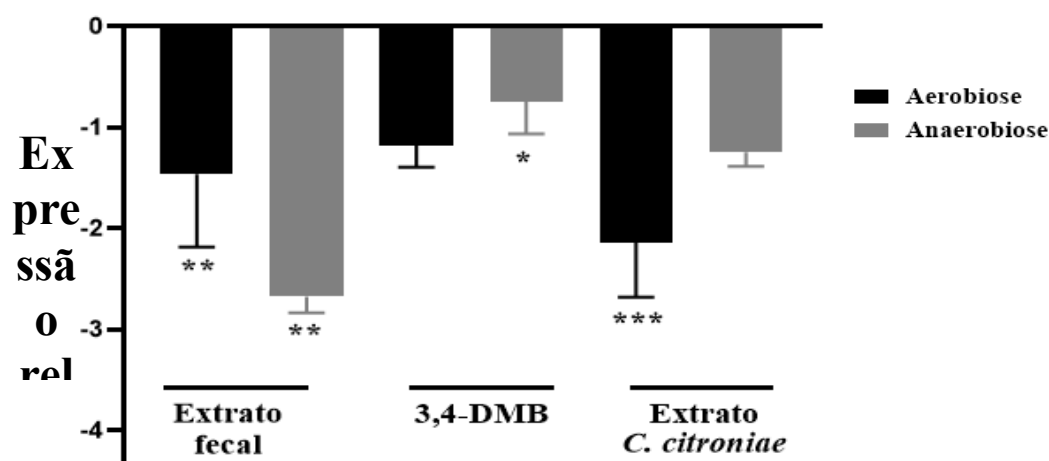
Legenda: *Salmonella* foi cultivada em anaerobiose na presença de EF (gráfico A, linha verde), ácido 3,4-DMB (gráfico B, linha amarelo escuro) e ECP de *C. citroniae* (gráfico C, linha laranja escuro). A linha azul corresponde ao controle (acetato de etila) e a linha vermelha controle (DMSO). $p=0,7393$ (controle acetato de etila vs. extrato fecal); $p=0,9728$ (DMSO vs. ácido 3,4-DMB.) e $p=0,9357$ (controle acetato de etila vs. ECP de *C. citroniae*). Os testes de comparação das curvas de crescimento foram feitos ao final de 18 horas de incubação das culturas.

5.2. Efeito de EF, ECP de *C. citroniae* e do ácido 3,4-DMB na expressão de gene *hila* em *Salmonella*.

Tendo como pilares estudos anteriores do nosso grupo cujos resultados mostraram que a expressão de *hila* é reprimida tanto na presença de EF em aerobiose (Antunes *et al.*, 2014) como na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose (Peixoto *et al.*, 2017), reavaliamos a expressão desse gene por RT-PCR nessas mesmas condições. Nossos resultados apresentaram um perfil de repressão semelhante aos resultados dos estudos anteriormente citados. Posto isto, tomamos a expressão desse gene como um controle interno para a avaliação da expressão dos genes de HK dos TCS de *Salmonella*. Além disso, avaliamos a expressão de *hila* na presença do ECP de *C. citroniae* em aerobiose, bem como a sua expressão na presença de EF, ECP de

C. citroniae e do ácido 3,4-DMB em anaerobiose. Nossos resultados mostram que a expressão do *hilA* é reprimida em todas as condições testadas, quer em aerobiose como em anaerobiose. A repressão foi estatisticamente significativa na presença de: EF, tanto em aerobiose como em anaerobiose ($p=0,0046$ e $p=0,0053$, respectivamente); na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose ($p=0,0180$) e na presença do ECP de *C. citroniae* em aerobiose ($p<0,0001$). Na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose e na presença do ECP de *C. citroniae* em anaerobiose, a repressão não foi estatisticamente significativa ($p=0,1467$ e $p=0,1735$ respectivamente), como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Expressão relativa do gene *hilA* de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. Barras pretas correspondem a culturas realizadas em aerobiose e barras cinza correspondem a culturas realizadas em anaerobiose⁵. EF: $p=0,0046$ e $p=0,0053$, em aerobiose e anaerobiose, respectivamente. Ácido 3,4-DMB: $p=0,1467$ e $p=0,0180$, em aerobiose e anaerobiose, respectivamente. ECP de *C. citroniae*: $p<0,0001$ e $p=0,1735$, em aerobiose e anaerobiose, respectivamente). Os resultados representam a média de seis ($n=6$) culturas na presença de EF em aerobiose e quatro ($n=4$) medições independentes para os outros casos. As barras de erro representam o desvio padrão da média⁶.

A expressão de *hilA* é controlada pela ação combinada de três ativadores transcricionais da família AraC: HilC, HilD e RstA. Estudos demonstraram que HilC, HilD e RstA podem se ligar individualmente ao promotor de *hilA*, regulando-o de forma positiva em resposta a vários sinais ambientais e intracelulares (Saini; Rao, 2010). Estudos anteriores já haviam mostrado que a deleção de *hilC*, *hilD* ou *rtsA* causam uma diminuição na expressão de *hilA* (Ellermeier;

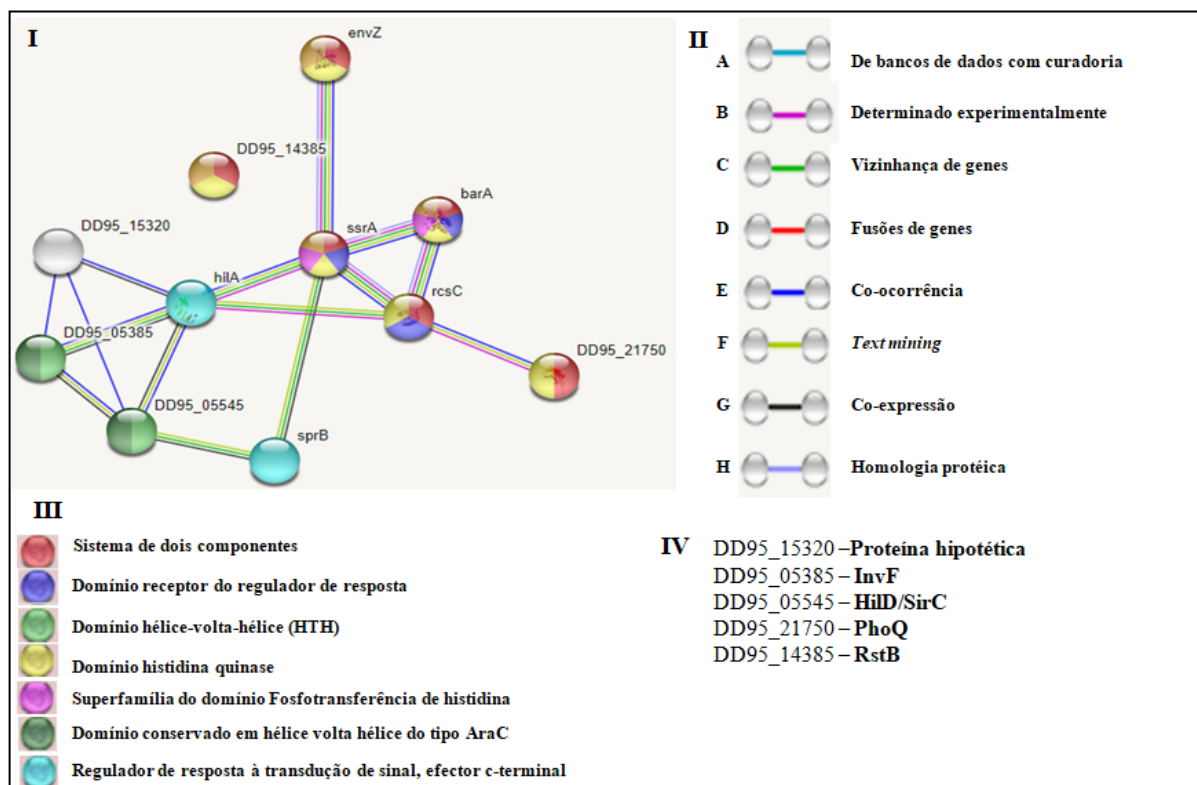
⁵A descrição das barras é a mesma para os próximos gráficos. Para evitar repetição, essas descrições estarão omitidas das próximas legendas.

⁶Para evitar repetição, optamos por colocar o significado das barras de erro apenas no primeiro gráfico.

Ellermeier; Slauch, 2005). A expressão dos genes de invasão codificados dentro do SPI-1 são reguladas principalmente por HilA, que é considerado o regulador mestre de SPI-1, e pelos reguladores transicionais InvF e SprB (Saini; Rao, 2010).

A Figura 6 mostra uma rede de interação das proteínas, tanto das quinase sensoras como das proteínas ativadoras transcricionais que modulam e regulam a expressão de HilA. A escolha dos genes para compor essa rede de interação teve como critério base a compilação de todas as proteínas que têm participação direta ou indireta na regulação da expressão do *hila*. Para isso revisamos artigos cujo tema é a regulação de *hila* e SPI-1 como um todo (Bajaj *et al.*, 1996; Lucas *et al.*, 2000; Lucas; Lee, 2001; Jones, 2005; Ellermeier; Slauch, 2007; Smith *et al.*, 2016; Ashari *et al.*, 2019).

Figura 7 - Rede de interação entre as principais proteínas envolvidas na regulação direta ou indireta dos genes codificados dentro de SPI-1.



Legenda: I) TCS e proteínas da família AraC envolvidos na regulação da expressão de *hila*; II) legenda das cores de cada linha (associação prevista) na rede de interação; III) legenda das cores nas esferas referentes às diversas funções que uma mesma proteína pode desempenhar nessa rede de interação e IV) proteína correspondente aos respectivos códigos na rede de interação. Para a construção dessa rede, as sequências das proteínas (TCS e família AraC) da nossa cepa de *Salmonella* (*Salmonella* Typhimurium, SL1344) foram comparadas com as sequências das proteínas (TCS e família AraC) da cepa 90371 (que é a cepa de *Salmonella* Typhimurium disponível no STRING) usando como ferramenta de comparação o BLASTp. Fonte: STRING, versão 11,0 (<https://string-db.org/>).

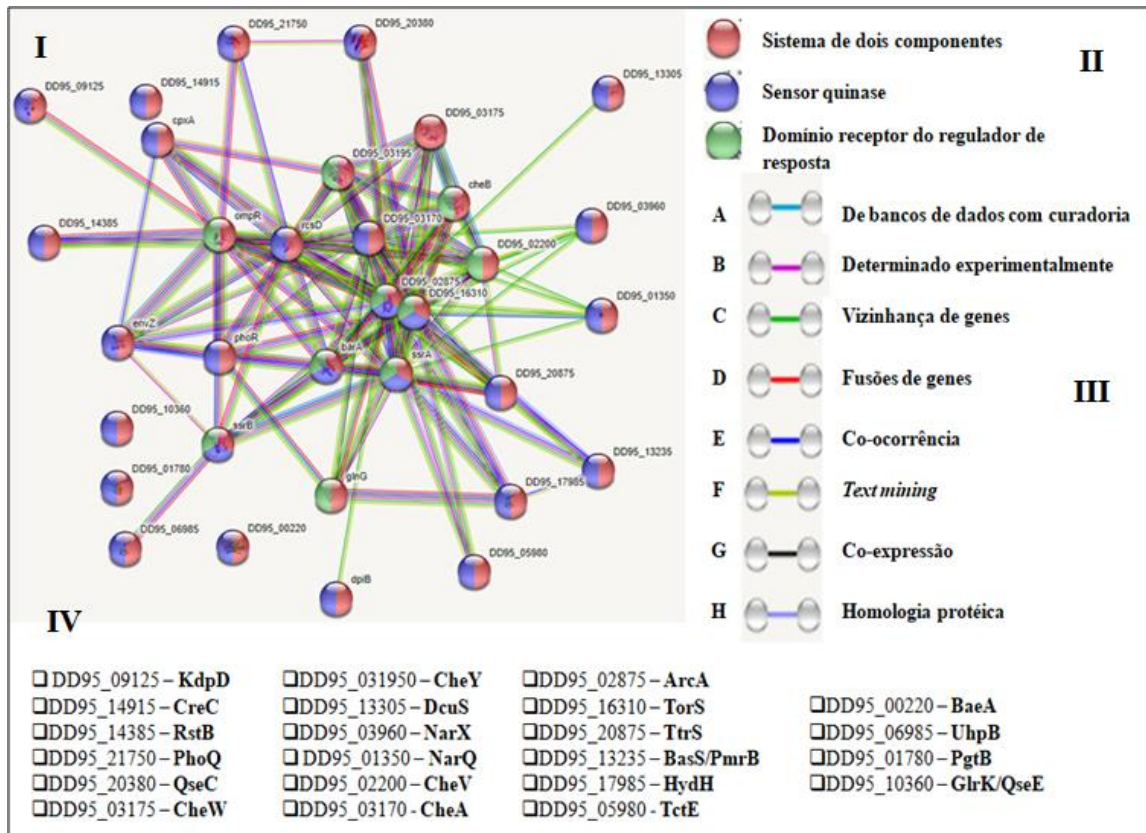
5.3. Efeito de EF, ECP de *C. citroniae* e do ácido 3,4-DMB na expressão de genes (quinases sensoras) dos TCS de *Salmonella*.

Salmonella SL1344 tem pelo menos 27 sistemas de dois componentes anotados na base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Figura 3). A maior parte desses sistemas está bem caracterizado; entretanto, a forma como são modulados por metabólitos da microbiota intestinal ainda não foi bem estudada. Assim, nos propomos a investigar o efeito do metaboloma intestinal humano na expressão de genes codificadores das proteínas quinase sensoras dos TCS de *Salmonella*, responsáveis pela percepção de sinais químicos específicos no ambiente intestinal.

A presença de EF, ácido 3,4-DMB e do ECP de *C. citroniae* regularam, de forma diferencial, a expressão de genes HK do TCS de *Salmonella*. Os resultados foram organizados em três grupos de acordo com o nível a que a expressão desses foram regulados: a) pouco regulados, quando o efeito de nenhum desses compostos se configurou significativos. O nível de regulação era no máximo duas vezes comparado aos respectivos controles, porém, feito os testes estatísticos (teste *t*), entre cada condição e seu respectivo controle não mostrou uma diferença e efeito significativo. Um total de onze genes HK (*arcB*, *baeS*, *basS*, *barA*, *dcuS*, *glrK*, *hydH*, *kdpD*, *pgtB*, *tctE* e *rstB*) foram regulados com esse perfil; b) moderadamente regulados, quando, pelo menos um dos compostos e numa das condições (aerobiose ou anaerobiose) regulou de forma significativa a expressão de genes HK, a ativação ou repressão da expressão desses genes por esses compostos era dois ou três vezes comparado aos respectivos controles e, essa regulação se configurou estatisticamente significativo.

Dez genes HK (*creC*, *cheA*, *cpxA*, *glnG*, *narQ*, *narX*, *phoR*, *ttrS*, *rscC* e *uhpB*) tiveram suas expressões reguladas por esses compostos; c) muito regulados, quando pelo um dos compostos e numa das condições (aerobiose ou anaerobiose) regulou de forma significativa a expressão desses genes, em muitos casos os níveis de regulação foram acima de quatro vezes comparados aos respectivos controles. Seis genes (*citA*, *envZ*, *phoQ*, *qseC*, *torS* e *ssrA*) tiveram suas expressões regulados com esse perfil. Os controles foram todos normalizados para um, e a comparação foi feita no sentido de ver se os compostos aumentaram (ativação) ou diminuiram (repressão) a expressão dos genes em relação ao controle (e nos gráficos, os controles aparecem como zero, o próprio eixo X).

Figura 8 - Rede de interação entre as proteínas quinase sensoras de TCS de *Salmonella*.



Legenda: I) Rede de interação de todas as quinase sensoras de TCS e alguns reguladores de resposta. II. Legenda das cores das esferas na rede de interação. III. Legenda das cores de cada linha (associação prevista) na rede de interação. IV. Proteína correspondente aos respectivos códigos na rede de interação. A rede resulta de sequências proteicas da cepa de *Salmonella* SL1344, submetidas ao BLASTp com sequências da cepa 90371 (cepa de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium disponível na base de dados STRING). Fonte: STRING, versão 11,0 (<https://string-db.org/>).

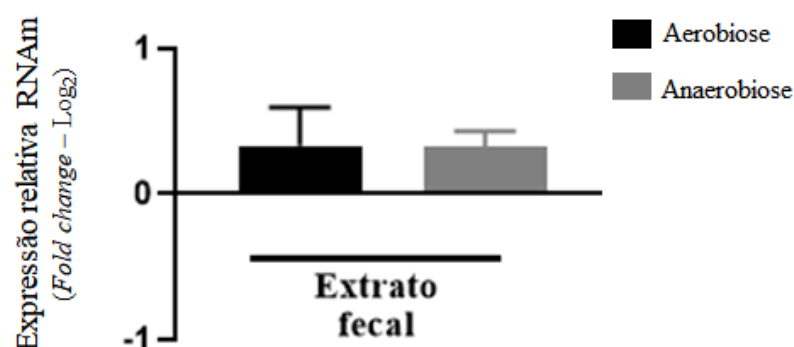
De referir ainda que, muitos genes não foram avaliadas em todas as condições, por motivos como, se viu que esses não eram muito relevantes para a virulência da bactéria, não foram regulados de forma significativa pelo EF e por fim porque eram muitos genes (27 genes) a serem testadas em seis condições diferentes, e isso demandou tempo e um custo muito alto e, por isso demos prioridade aos mais importantes. A tabela 4 mostra o resumo dos resultados da expressão gênica dos genes HK dos TCS de *Salmonella*.

5.3.1. Genes pouco regulados

5.3.1.1 Expressão relativa do gene quinase sensor *arcB* (TCS ArcAB).

Tanto em *E. coli* como em *Salmonella*, o TCS Arc (*Anoxic Redox Control*), ArcBA opera em resposta a uma mudança de aerobiose para anaerobiose (Yong Sun Lee, *et al.*, 2000). Além da função de permitir a adaptação bacteriana à mudança dos níveis de oxigênio, promove também a sobrevivência intracelular em macrófagos, contribuindo assim para a infecção sistêmica, modulação do metabolismo celular, biossíntese e a mobilidade de *Salmonella* crescida tanto em aerobiose como em anaerobiose (Pardo-Esté *et al.*, 2018). Dessa forma, avaliamos como o EF afeta a expressão da quinase sensora *arcA*, tanto em aerobiose como em anaerobiose. Nossos resultados mostram que, embora o EF contribua para a ativação da expressão desse gene em ambas as condições, essa ativação não foi estatisticamente significativa ($p=0,5468$ e $p=0,2893$) na presença de EF em aerobiose e anaerobiose respectivamente, como mostra a figura 9.

Figura 9 - Expressão relativa do gene *arcB* (ArcBA) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



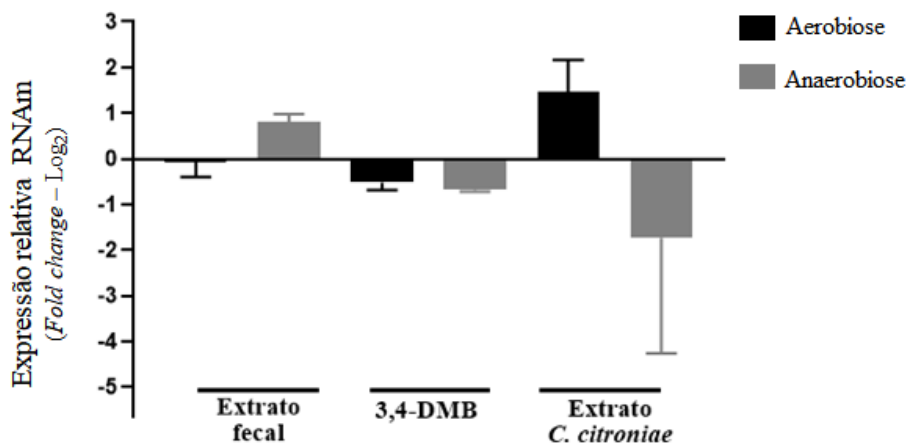
Legenda: As culturas foram realizadas na presença de EF. O EF aumentou a expressão de *arcB* tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, mas esse efeito não foi significativo em nenhuma das condições. Os resultados representam a média de oito (n=8) e quatro (n=4) medições independentes de culturas feitas em aerobiose e anaerobiose, respectivamente. P valor: 0,5468 e 0,2893, respectivamente.

5.3.1.2. Expressão relativa do gene quinase sensor *baeS* (TCS BaeSR).

Estudos tem demonstrado o papel do TCS BaeSR de *Salmonella* na detecção de ciprofloxacina, um antibiótico bactericida, e na regulação positiva da *mdtA*, uma bomba de efluxo implicada na resistência a antibióticos (Guerrero *et al.*, 2012, Guerrero *et al.*, 2013). Avaliamos, por meio de expressão gênica por PCR em tempo real, se o EF, ECP de *C. citroniae* e o ácido 3,4-DMB afetam de alguma forma a expressão da quinase sensora *baeS*, tanto em aerobiose como em anaerobiose. Nossos resultados mostram que embora as diferentes

condições afetem diferencialmente a expressão de *baeS*, em nenhuma das condições o efeito foi estatisticamente significativo, como mostra a figura 10.

Figura 10 - Expressão relativa do gene *baeS* (BaeSR) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

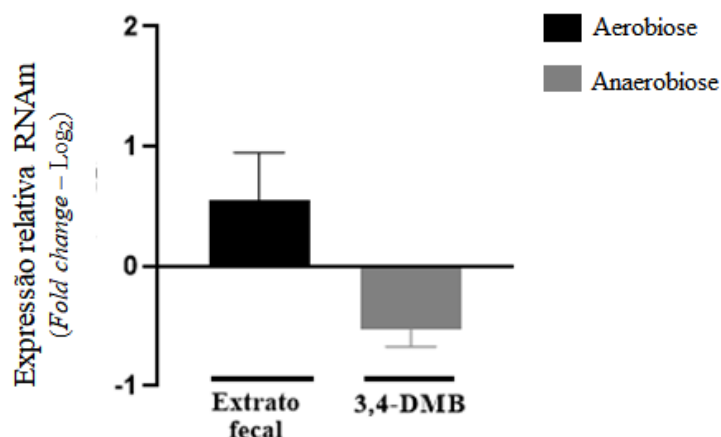


Legenda: Culturas foram realizadas na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. Expressão de *baeS* foi reprimida na presença de EF (aerobiose, $p=0,8881$), na presença do ácido 3,4-DMB (aerobiose e anaerobiose, $p=0,0768$ e $p=0,2653$, respectivamente) e na presença de ECP de *C. citroniae* (anaerobiose, $p=0,3690$). A expressão foi ativada na presença de EF (anaerobiose, $p=0,1646$) e ECP de *C. citroniae* em aerobiose ($p=0,2600$). Os resultados correspondem a média de oito ($n=8$) medições para EF em aerobiose e quatro ($n=4$) para as restantes condições.

5.3.1.3. Expressão relativa do gene quinase sensor *basS* (TCS BasSR).

O TCS BasSR, também chamado de PmrA-PmrB, é importante na virulência de *Salmonella*. As modificações controladas por BasS-BasR no LPS conferem resistência aos polipeptídeos antimicrobianos catiônicos (polimixina B), modificando e alterando a superfície e reduzindo o local de ligação, o que pode permitir a sobrevivência da bactéria em macrófagos (Hyytiäinen *et al.*, 2003). Esse TCS regula também a expressão de um sistema complexo que inclui *pmrCAB*, *pmrE*, *pmrG*, *pmrFHJKLM*, *cptA* e vários outros genes (Merighi, Carroll-Portillo, Septer, Bhatiya e Gunn, 2006). Avaliamos a expressão do *basS* no EF em aerobiose e na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose. Os nossos resultados mostraram que o EF em aerobiose ativa a expressão do *basS* ainda que de forma não significativa. Já o ácido 3,4-DMB reprime a expressão do *basS*, mas essa repressão não foi estatisticamente significativa, como mostrado na figura 11.

Figura 11- Expressão relativa do gene *basS* (BasSR) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

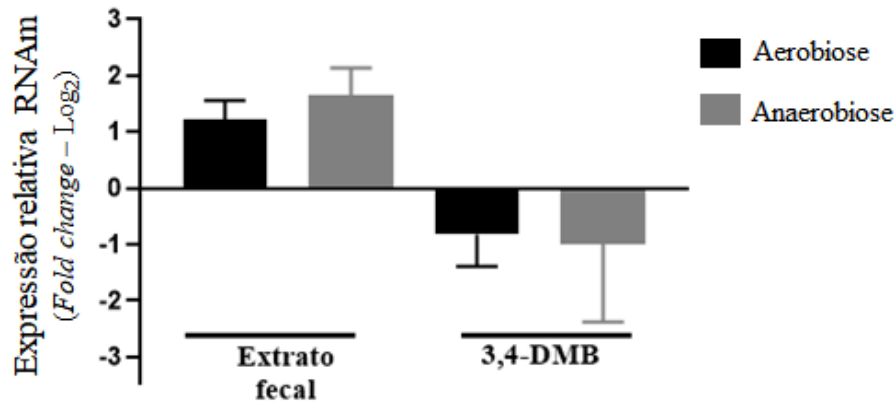


Legenda: Culturas foram realizadas na presença do EF em aerobiose e na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose. A expressão de *basS* foi ativada na presença de EF ($p=0,04930$) e reprimida na presença do ácido 3,4-DMB ($p=0,0717$). Resultados representam a média de quatro medições independentes.

5.3.1.4. Expressão relativa do gene quinase sensor *barA* (TCS BarA-SirS).

O TCS BarA-SirS é bem conservado em muitas espécies de γ -proteobactérias e regula numerosos processos celulares, controlando predominantemente a expressão de um subconjunto de pequenos RNAs não codificadores. Além disso, controla a produção de fatores extracelulares que funcionam como exoenzimas ou toxinas, a detecção de moléculas do *quorum sensing*, a mobilidade e diversas características metabólicas. Assim, para muitas espécies bacterianas, o TCS BarA-SirS (GacS-GacA em *Pseudomonas*) é fundamental para a regulação e coordenação da patogenicidade e comportamento de grupo (Binnenkade; Lassak; Thormann, 2011; Francis; Stevenson; Porter, 2017). A expressão do gene *barA*, que codifica a quinase sensora BarA, foi ativada na presença do EF tanto em aerobiose como em anaerobiose; porém, este efeito não foi estatisticamente significativo. Na presença do ácido 3,4-DMB, a expressão do *barA* foi reprimida, tanto em aerobiose como em anaerobiose, como mostra a figura 12.

Figura 12- Expressão relativa do gene *barA* (BarA-SirA) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

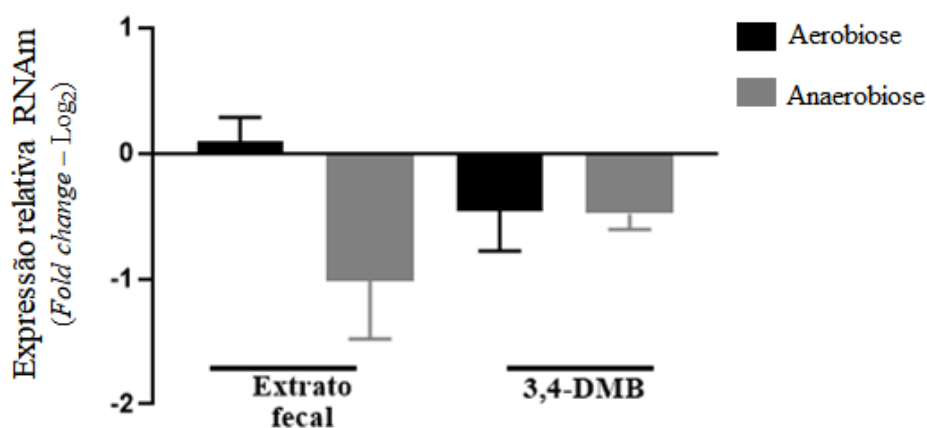


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão de *barA* foi ativada na presença do EF (aerobiose e anaerobiose, $p=0,1679$, $p=0,1471$, respectivamente) e reprimida na presença do ácido 3,4-DMB (aerobiose e anaerobiose, $p=0,1019$ e $p=0,2414$, respectivamente). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.1.5. Expressão do gene quinase sensor *dcuS* (DcuSR).

O TCS DcuSR pertence à família de TCS CitB. A sua estrutura e função estão bem descritos em *E. coli*. Porém, em *Salmonella* os estudos com este TCS são escassos. Em *E. coli* o TCS DcuSR está envolvido com a capacidade da bactéria detectar, usar e metabolizar C4-decarboxilatos, como succinato, fumarato, molato, aspartato e tartarato como únicas fontes de carbono e energia durante o crescimento aeróbico e anaeróbico e induz a expressão de genes para sua utilização. O TCS DcuSR induz a transcrição de genes do operon *frdABCD*, que codificam as enzimas associadas ao ciclo de ácido cítrico necessárias para o metabolismo e uso dos C4-decarboxilases (Abo-Amer *et al.*, 2004). A quinase sensora DcuS requer DctA (em condições aeróbicas) ou DcuB (em condições anaeróbicas) para sua função normal (Davies *et al.*, 1999). Avaliamos como o EF e o ácido 3,4-DMB afetam a expressão do gene *dcuS*, que codifica a quinase sensora DcuS, tanto em aerobiose como em anaerobiose. Com exceção do EF em aerobiose, em que houve uma ligeira ativação, todas as outras condições reprimiram a expressão do *dcuS*, porém nenhum dos efeitos foram estatisticamente significativos, como pode ser visto na figura 13.

Figura 13 - Expressão relativa do gene *dcuS* (DcuSR) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

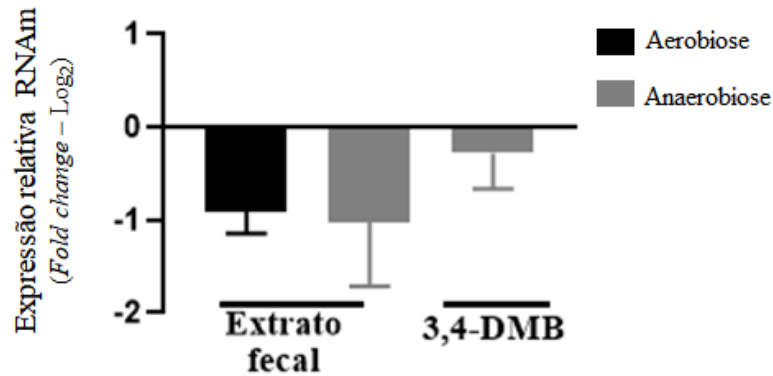


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão do gene foi ativada na presença de EF em aerobiose e reprimida nas outras condições. Em todas as condições, EF em anaerobiose e 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose, o efeito repressivo não foi estatisticamente significativo, como indicam os valores de p: 0,808, 0,0600, 0,1892 e 0,2439, respectivamente. Os resultados correspondem a quatro (n=4) medições independentes.

5.3.1.6. Expressão relativa do gene quinase sensor *glrK* (TCS GlrKR/ QseEF).

O TCS GlrKR, também conhecido como QseEF, está implicado na homeostase do envelope celular. Este sistema regula a expressão do pequeno RNA *glmY* e de *rpoE* de promotores dependentes de σ^{54} . A atividade desse sistema depende da lipoproteína *qseG* da membrana externa, que interage fisicamente com GlrK e pode ser responsável pela percepção do sinal. Na fase estacionária de crescimento bacteriano o TCS GlrKR regula positivamente a transcrição de *glmY* bem como o *rpoE* (a partir do promotor *rpoEP2* regulado por σ^{54}) em resposta à superexpressão de *qseG*. O TCS GlrKR contribui para a complexa regulação transcricional da *rpoE*, que permite resposta rápida a uma variedade de condições de estresse, incluindo alterações e defeitos do LPS (Klein *et al.*, 2016). Avaliamos a expressão do gene *glrK* na presença de EF em aerobiose e anaerobiose e na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose. Nossos resultados mostram que em ambas as condições a expressão do *glrK* foi reprimida; porém esta repressão não foi significativa, como mostra a figura 14.

Figura 14 - Expressão relativa do gene *glrK* (GlrKR) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

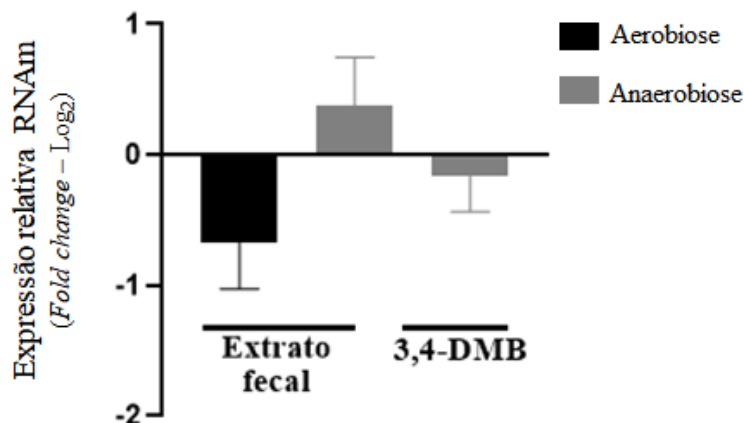


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão do gene *glrK* foi reprimida em ambas as condições: EF em aerobiose e anaerobiose ($p=0,2949$, $p=0,0801$) e na presença do ácido 3,4-DMB ($p=0,5373$). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.1.7. Expressão relativa do gene quinase sensor *hydH* (TCS HydHG).

O TCS HydHG responde a altas concentrações de zinco e chumbo no meio. A expressão de *zraP*, um gene inversamente orientado para o *hydHG*, e cujo produto parece estar envolvido na aquisição de tolerância a altas concentrações de Zn^{2+} , é estimulada por altas concentrações de Zn^{2+} e Pb^{2+} e essa estimulação requer HydH e HydG (Leonhartsberger *et al.*, 2001). Avaliamos como o EF em aerobiose e anaerobiose e o ácido 3,4-DMB em anaerobiose afetam a expressão do gene *hydH* e os resultados mostraram uma repressão, não significativa, na presença de EF em aerobiose e na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose. Na presença de EF em anaerobiose, a expressão foi ativada, porém sem alcançar significância estatística, como mostra a figura 15.

Figura 15 - Expressão relativa do gene *hydH* (HydHG) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão de *hydH* foi reprimida na presença de EF (aerobiose, $p=0,5181$) e na presença do ácido 3,4-DMB (anaerobiose, $p=0,7002$) e ativada na presença de EF (anaerobiose, $p=4944$). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.1.8. Expressão relativa do gene quinase sensor *kdpD* (TCS KdpDE).

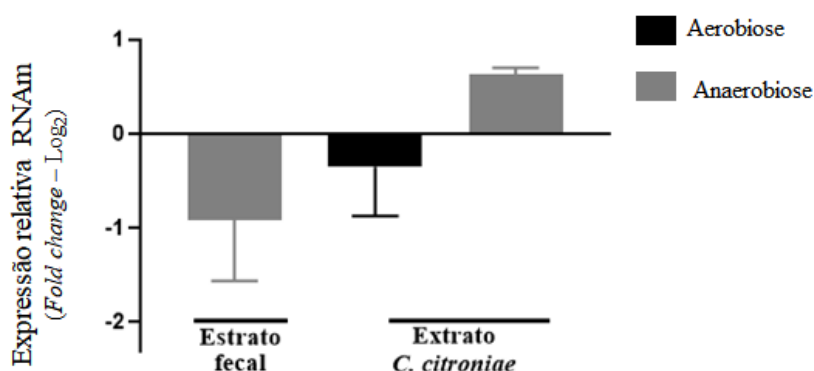
O TCS KdpDE, descrito e amplamente estudado pelo seu papel como regulador de transporte de K^+ , foi recentemente identificado como um regulador adaptativo envolvido na virulência e sobrevivência intracelular de bactérias patogênicas, incluindo, *E. coli* enterohemorrágica, *Yersinia pestis*, espécies de *Francisella* e *Salmonella* (Freeman; Dorus; Waterfield, 2013). Em virtude do papel central do K^+ na virulência, Freeman e colaboradores propuseram, no estudo realizado em 2013, que o TCS KdpDE atua como regulador de uma bomba de K^+ de alta afinidade, e tenha desenvolvido funções reguladoras relacionadas à virulência. Como base para essa hipótese, os autores revisaram o papel desse TCS na infecção bacteriana e resumiram evidências de que KdpDE está correlacionada com vários processos, tais como: regulação de uma variedade de fatores de virulência por ligação direta a promotores; regulação do KdpDE em resposta a condições como fagocitose, exposição a microbicidas, sinais de detecção de *quorum sensing*, hormônios produzidos por células hospedeiras, estresse oxidativo e estresse osmótico. Portanto, o TCS KdpDE parece ser um TCS adaptativo importante usado pela bactéria durante a infecção do hospedeiro, promovendo a sobrevivência bacteriana por meio de mecanismos relacionados e distintos de seu papel conservado na regulação do K^+ (Freeman; Dorus; Waterfield, 2013).

No mesmo ano da publicação do trabalho anterior, outro trabalho desenvolvido por Liu e seus colaboradores aprofundaram o entendimento do papel do transportador de ion K^+ (Trk)

de *Salmonella*, na secreção de proteínas efetoras do T3SS-1. Eles observaram que o comprometimento do transporte de K^+ por meio de exclusão de seus transportadores ou exposição aos moduladores químicos de transporte de cátions, gramicidina e valinomicina, resultava em defeito grave no T3SS-1 da SPI-1, e esse defeito no T3SS-1 não era devido a uma falha na regulação do pH intrabacteriano ou ATP (Liu *et al.*, 2013).

Nossos resultados mostraram que a regulação do gene *kdpD* não foi afetada de forma significativa na presença de EF e ECP de *C. citroniae*, como mostra a figura 16.

Figura 16 - Expressão relativa do gene *kdpD* (KdpD-KdpE) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

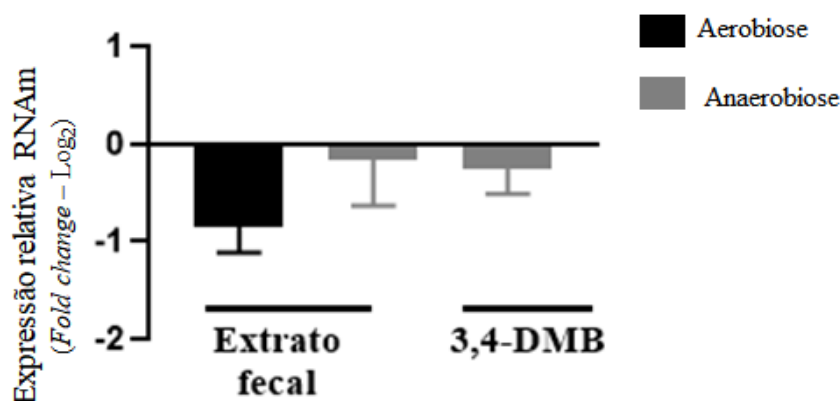


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e ECP de *C. citroniae*. Expressão de *kdpD* foi reprimida na presença de EF (anaerobiose, $p=0,1175$) e na presença ECP de *C. citroniae* (aerobiose, $p=0,686$), enquanto foi ativada na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose ($p=0,2361$). Os resultados representam a média de quatro medições independentes.

5.3.1.9. Expressão relativa do gene quinase sensor *pgtB* (TCS PgtAB).

O TCS PgtAB constitui um sistema de transporte de fosfoglicerato em *Salmonella*. Consiste em quatro genes codificados pelo operon *pgtABCP*, com o gene *pgtP* codificando o transportador e os genes *pgtABC* codificando as três proteínas reguladoras necessárias para controlar a expressão de *pgtP* (Niu; Jiang; Hong, 1995). Avaliamos a expressão do gene *pgtB* que codifica a quinase sensora PgtB na presença do EF em aerobiose e anaerobiose e na presença de ácido 3,4-DMB em anaerobiose. Nossos resultados mostram que nessas três condições avaliadas a expressão do *pgtB* foi reprimida; porém; em nenhum dos casos a repressão foi estatisticamente significativa, como mostra a figura 17.

Figura 17 - Expressão relativa do gene *pgtB* (PgtAB) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

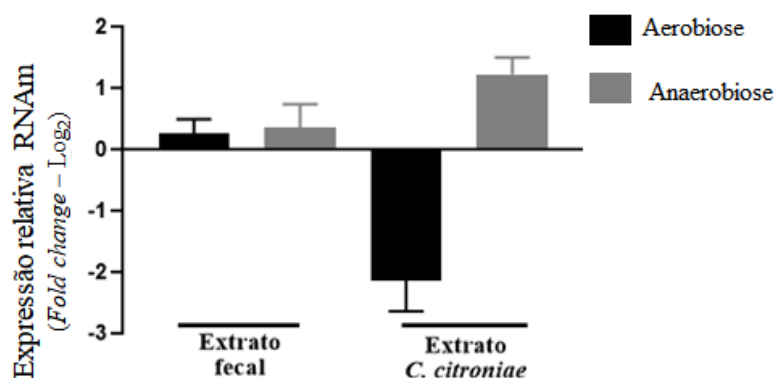


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão do gene *pgtB* foi reprimida em ambas as condições: EF em aerobiose e anaerobiose ($p=0,3795$, $p=0,7594$) e na presença do ácido 3,4-DMB ($p=0,5299$). Os resultados cartear-se à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.1.10. Expressão relativa do gene quinase sensor *rstB* (TCS RstBA).

O TCS RstBA está envolvido na regulação de vários processos importantes e críticos para a virulência de *Salmonella*. Vários estudos têm vindo a demonstrar há vários anos que esse TCS está envolvido na coordenação da invasão e na repressão de mobilidade de *Salmonella* no ambiente intestinal (Ellermeier; Slauch, 2003). Mais recentemente, foi demonstrado que o RstB reprime o operon *flhDC*, reprimindo a mobilidade de *Salmonella*, diferente do regulador HilD que regula de forma positiva o operon *flhDC*. Assim, a mobilidade flagelar é regulada tanto positiva (HilD) como negativamente (RstB) dentro das SPI-1 (Smith *et al.*, 2016). No mesmo ano outro estudo mostrou que processos como invasão, mobilidade, metabolismo de pirimidina e aquisição de ferro por *Salmonella* são regulados direta ou indiretamente pelo TCS RstBA (Tran *et al.*, 2016). Dessa forma, avaliamos se o EF, o ECP de *C. citroniae* e o ácido 3,4-DMB afetam de alguma forma a expressão do gene *rstB*, que codifica a quinase sensora RstB e, como mostra a Figura 17, nenhuma dessas condições afetou de forma significativa a expressão desse gene.

Figura 18 - Expressão relativa do gene *rstB* (RstBA) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

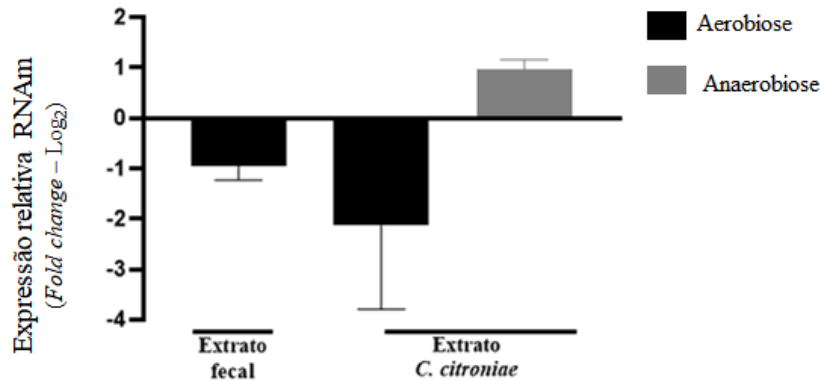


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e ECP de *C. citroniae*. A expressão de *rstB* foi ativada na presença de EF (aerobiose e anaerobiose, $p=0,5172$ e $p=0,5635$, respectivamente), e na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose ($p=0,0742$). A expressão de *rstB* foi reprimida na presença de ECP de *C. citroniae* em aerobiose ($p=0,2537$). Os resultados representam a média de oito ($n=8$, EF aerobiose) e quatro ($n=4$, para as restantes condições) medições independentes.

5.3.1.11. Expressão relativa do gene quinase sensor *tctE* (TCS TctDE).

Salmonella contém três sistemas de transporte dependentes de proteínas de ligação periplasmáticas para a absorção de citrato e outros ácidos tricarbóxicos, designados TctI, TctII e TctIII. O sistema TctI consiste no produto de três genes estruturais organizados em um operon, *tctCBA* (Widenhorn; Somers; Kay, 1988). O operon *tctCBA* codifica genes denominados de transportadores tricarbóxicos (*tct*), responsáveis pela captação de fontes de carbono tricarbóxico, como o ácido cítrico. Esse operon é regulado pelo TCS TctDE, onde *tctE* codifica a quinase sensora, que detecta compostos tricarbóxicos no alimento e regula a expressão do operon *tct* para captação e metabolismo desses compostos (Taylor; Zhang; Mah, 2019). Nossos resultados após a avaliação da expressão gênica de *tctE* na presença de EF e ECP de *C. citroniae* mostraram que na presença de EF, culturas de *Salmonella* realizadas em aerobiose tiveram esse gene reprimido, embora de forma não estatisticamente significativa. O mesmo resultado se verificou com culturas realizadas na presença de ECP de *C. citroniae* em aerobiose. Porém, em anaerobiose o ECP de *C. citroniae* ativou a expressão do *tctE*, mas não de forma muito significativa, como mostra a figura 19.

Figura 19 - Expressão relativa do gene *tctE* (TctED) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e ECP de *C. citroniae*. A expressão do *tctE* foi reprimida em aerobiose na presença de EF e ECP de *C. citroniae* ($p=0,4161$ e $p=0,2902$, respectivamente), enquanto na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose a expressão foi ativada ($p=0,1037$). Os resultados representam a média de quatro medições independentes.

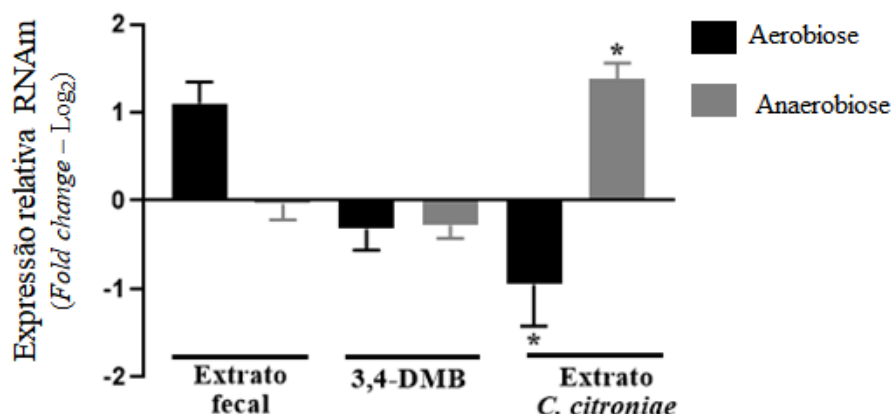
5.3.2. Genes moderadamente regulados

5.3.2.1. Expressão relativa do gene quinase sensor *creC* (TCS CreBC).

O TCS CreBC é um sistema global de detecção e controle que afeta genes envolvidos em uma variedade de funções como enzimas intermediárias de catabolismo. Em *E. coli* O regulon *cre* controla a expressão de vários genes. O TCS CreCB está localizado no operon *creABCD* em *E. coli*. O regulon *cre* é ativada durante o crescimento em meios mínimos quando fontes de carbono glicolítico estão sendo fermentadas, bem como durante o crescimento aeróbico quando os produtos de fermentação estão sendo usados como fontes de carbono. O TCS CreCB é essencial para a ativação da expressão do regulon *cre*, já as proteínas CreA e CreD, codificados como parte do operon *creABCD* parecem não exercer papel na ativação do regulon *cre* (Godoy *et al.*, 2016).

Nossos resultados mostraram que o gene *creC* foi diferencialmente regulado na presença de EF, ECP de *C. citroniae* e do ácido 3,4-DMB. A expressão de *creC* foi ativada significativamente na presença do EF em aerobiose e na presença do ECP de *C. citroniae* em anaerobiose. Já nas outras condições a expressão foi reprimida, com destaque para a repressão significativa causada pela presença de ECP de *C. citroniae* em aerobiose. Os resultados destes ensaios são mostrados na figura 20.

Figura 20 - Expressão relativa do gene *creC* (CreBC) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



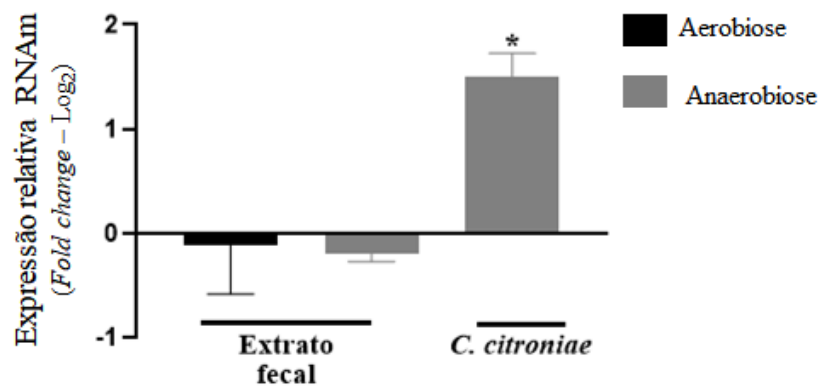
Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. A expressão de *creC* foi reprimida nas condições: EF em anaerobiose ($p=0,9159$); ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose ($p=0,4534$ e $p=0,1611$, respectivamente); e ECP de *C. citroniae* em aerobiose ($p=0,0113$). A expressão de *creC* foi ativada nas condições: EF em aerobiose ($p=0,0266$) e ECP de *C. citroniae* em anaerobiose ($p=0,0264$). Os resultados correspondem à média de oito réplicas ($n=8$) para EF e 3,4-DMB em aerobiose e quatro ($n=4$), para as restantes condições.

5.3.2.2. Expressão relativa do gene quinase sensor *cheA* (TCS CheAB).

Como dito anteriormente, todos os microrganismos possuem mecanismos que lhes permitem monitorar e sobreviver num ambiente. Muitas bactérias se movem de um lugar para o outro e podem alterar seus movimentos de acordo com as características e composição do ambiente. A quimiotaxia é o sistema mais bem compreendido entre todos os sistemas de transdução de sinal que controlam o movimento. Enquanto o sistema que regula a motilidade difere entre os microrganismos, o mecanismo de controle geral da quimiotaxia é conservado em todas as bactérias e arqueias (Karatan E. *et al.*, 2001). Quimiotaxia é um fenômeno observado em bactérias móveis que lhes permitem sentir mudanças na concentração de vários compostos extracelulares e mudar seus comportamentos de forma a mover-se em direção a ambientes favoráveis. Esse processo envolve uma excitação dependente da fosforilação e uma adaptação dependente da metilação (Karatan E. *et al.*, 2001). Juntamente com *E. coli*, *Salmonella* serviram como modelos de estudos que levassem ao entendimento do paradigma do processo de quimiotaxia a nível molecular. Os aglomerados quimiorreceptores controlam a atividade de um TCS que compreende a proteína sensora quinase CheA e os reguladores de resposta CheY e CheB. A proteína sensora quinase CheY fosforilado controla a troca de motores flagelares, enquanto CheB fosforilado medeia a adaptação (Porter S. L. *et al.*, 2011).

O TCS CheAB é o tipo mais comum de sistema de transdução de sinal em bactérias e controla diversos processos, como expressão de genes do flagelo, esporulação, formação de biofilme, estabelecimento de relações simbióticas e principalmente a quimiotaxia (Garrity; Ordal, 1998; Blat *et al.*, 1998, Porter S. L. *et al.*, 2011). Para além dessas duas proteínas fazem parte do complexo sistema de quimiotaxia, outras proteínas desempenham papéis relevantes para o funcionamento coordenada e eficiente do processo de quimiotaxia como são os casos das proteínas CheW e CheV estão envolvidos com o acoplamento da sensora quinase CheA com proteínas de quimiotaxia que aceitam um grupamento metil (MCPs) e na adaptação da bactéria à quimiotaxia, respectivamente (Karatan E. *et al.*, 2001). Já a proteína CheZ é um responsável pela remoção de sinal e acelerar a defosforilação de CheY fosforilado (Boesch; Silversmith; Bourret, 2000). Nossos resultados de expressão gênica mostraram que o gene *cheA* foi ligeiramente reprimido na presença de EF tanto em aerobiose como em anaerobiose. Na presença do ácido 3,4-DMB, a expressão do gene *cheA* foi significativamente ativada, como mostra a figura 21.

Figura 21 – Expressão relativa da quinase sensora *cheA* (TCS CheAB).



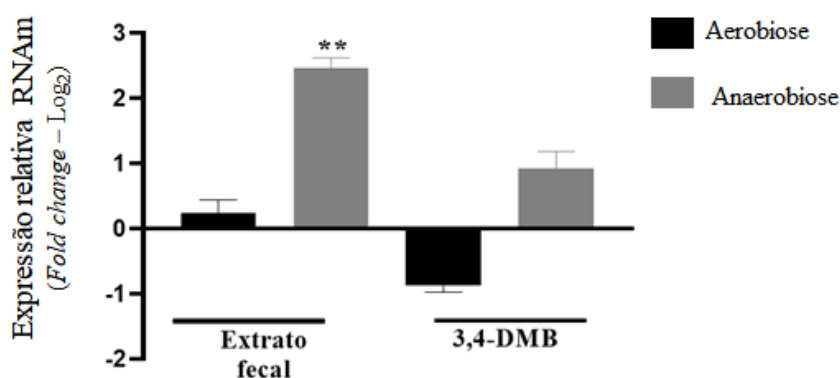
Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão de *cheA* foi reprimida na presença do EF (aerobiose e anaerobiose, $p=0,9389$ e $p=0,1197$, respectivamente) e ativada na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose ($p=0,0162$). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.2.3. Expressão relativa do gene quinase sensor *cpxA* (TCS CpxAR).

A presença e ausência de estresse no envelope celular são os estímulos que ativam as atividades de quinase e fosfatase de CpxA, respectivamente, e por sua vez controlam o nível de fosforilação do seu regulador de resposta cognato, CpxR (CpxR~P) (De La Cruz *et al.*, 2015). Avaliamos a expressão do gene *cpxA*, que codifica a quinase sensora CpxA do TCs CpxAR na

presença de EF em anaerobiose e anaerobiose e na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose. Os resultados mostram que em ambas as condições avaliadas a expressão de *cpxA* foi ativada, com destaque para a expressão na presença de EF em anaerobiose, em que a ativação da expressão foi estatisticamente significativa, ($p=0,0022$). A expressão de *cpxA* na presença de EF em aerobiose e na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose foi ativada de forma não significativa ($p=0,4506$ e $p=0,3892$, respectivamente), como mostra a figura 22.

Figura 22 - Expressão relativa do gene *cpxA* (CpxAR) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

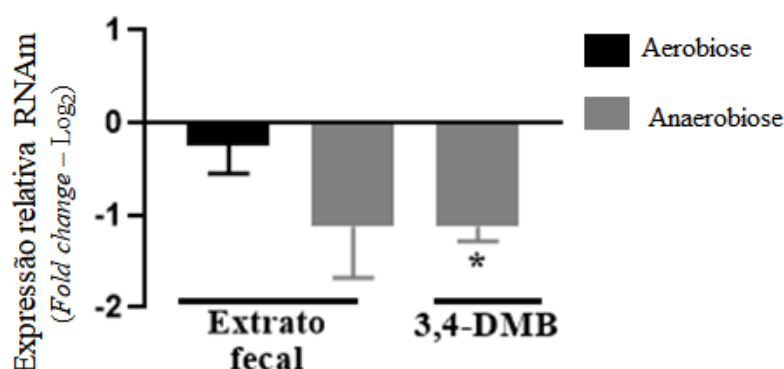


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e ECP de *C. citroniae*. *cpxA* foi ativado tanto na presença de EF (aerobiose e anaerobiose, $p=0,4506$ e $p=0,0022$, respectivamente) como na presença de ECP de *C. citroniae* ($p=0,3892$). Os resultados representam a média de oito medições ($n=8$) para EF em aerobiose e quatro ($n=4$) para os dois últimos casos.

5.3.2.4. Expressão relativa do gene quinase sensor *glnG* (TCS GlnGL).

O TCS GlnGL (NtrBC) pertence à família de TCS NtrC em *Salmonella*. GlnG é a quinase sensora que é ativada em resposta a condições limitadas de nitrogênio (Hartman; Samuels; Karls, 2016). O gene *glnG* codifica a proteína GlnG, que é um regulador positivo e um regulador negativo da expressão de *glnA*, o gene estrutural da glutamina sintase, bem como um regulador positivo da expressão de vários genes cujos produtos estão envolvidos na absorção e degradação de compostos contendo nitrogênio (Pahel; Rothstein; Magasanik, 1982). Nossos resultados mostraram que a expressão do gene *glnG* foi reprimida com EF em aerobiose e anaerobiose, e na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose, nesse último de forma estatisticamente significativa, como mostra a figura 23.

Figura 23 - Expressão relativa do gene *glnG* (GlnGL) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR



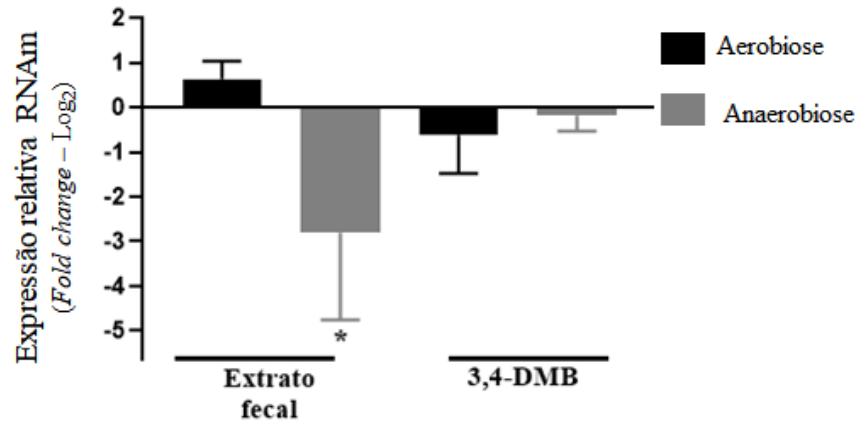
Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão do gene *glnG* foi reprimida em ambas as condições: EF em aerobiose e anaerobiose ($p=0,7345$ e $p=0,0995$, respectivamente) e na presença do ácido 3,4-DMB ($p=0,0373$). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.2.5. Expressão relativa dos genes quinase sensores *narX* (TCS NarXL) e *narQ* (TCS NarQP).

Os TCS NarXL e NarQP estão envolvidos com respiração bacteriana em ambiente de anaerobiose, como o ambiente intestinal. Como resultado do processo inflamatório induzido por *Salmonella* no ambiente intestinal são gerados compostos químicos como nitrato e nitrito, que são usados pela bactéria como aceptores alternativos de elétrons. A capacidade para detectar a presença desses compostos no ambiente intestinal por *Salmonella* é regulada por dois TCS, NarXL e NarQP. A proteína NarX é a quinase sensora no TCS NarXL e o NarQ é o sensor no TCS NarQP. NarX detecta a presença de nitrito, enquanto NarQ detecta nitrito e nitrato no ambiente externo. Ao detectarem esses compostos, esses dois sensores se autofosforilam e transferem o grupo fosforil aos respectivos reguladores de resposta, NarL e NarP, que por sua vez se ligam ao DNA para controlar a indução dos operons *nar* e *nap*, respectivamente (Poole, 2016).

Avaliamos a expressão dos genes que codificam os sensores NarX e NarQ na presença de EF e do ácido 3,4-DMB tanto em aerobiose como em anaerobiose. Nossos resultados mostram que a expressão de *narX* foi ativada na presença de EF em aerobiose, mas essa ativação não foi estatisticamente significativa. Além disso, o gene apresentou expressão reprimida nas outras condições acima mencionadas, com destaque para a repressão na presença de EF em anaerobiose, que foi estatisticamente significativa, como mostra a figura 24.

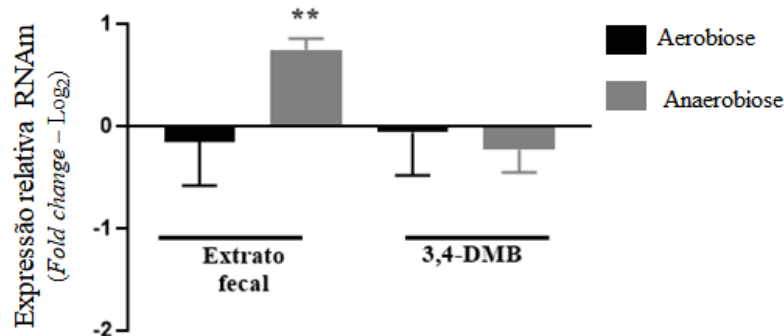
Figura 24 - Expressão relativa do gene *narX* (NarXL) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão do *narX* foi ativada na presença de EF em aerobiose ($p=0,5050$) e reprimida em anaerobiose na presença de EF ($p=0,0381$) e na presença de ácido 3,4-DMB (aerobiose e anaerobiose, $p=0,4060$ e $p=0,7301$, respectivamente). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

A expressão do gene *narQ* foi ativada significativamente na presença de EF em anaerobiose e reprimida nas outras condições (EF em aerobiose e na presença de ácido 3,4-DMB). Porém nenhuma dessas repressões foi estatisticamente significativa, como pode ser visto na Figura 25.

Figura 25 - Expressão relativa do gene *narQ* (NarQP) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

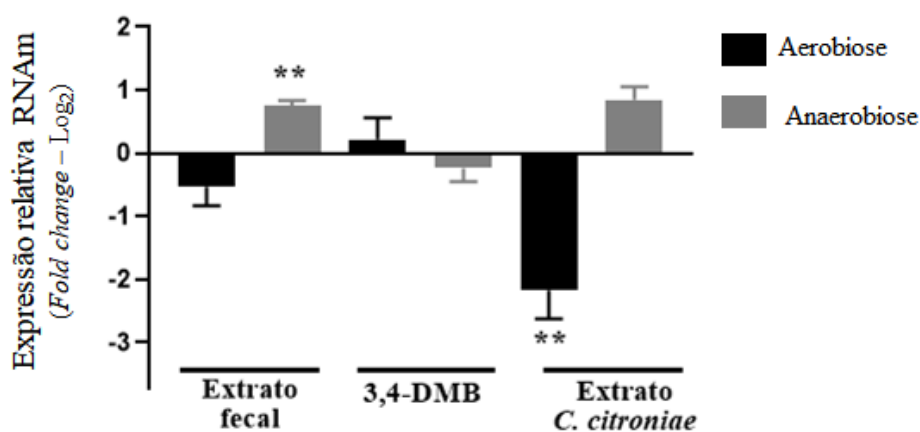


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão de *narQ* foi reprimida nas condições: EF aerobiose ($p=0,8097$); ácido 3,4-DMB (aerobiose e anaerobiose, $p=0,8905$ e $p=0,4791$, respectivamente). Já na presença de EF em anaerobiose a expressão de *narQ* foi ativada ($p=0,0130$). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.2.6. Expressão relativa do gene quinase sensor *phoR* (TCS PhoRB).

A alteração na expressão de *phoR* na presença de EF em aerobiose não foi estatisticamente significativa ($p=0,1861$). Diferente do resultado anterior, em anaerobiose o EF aumentou significativamente a expressão de *phoR* em comparação ao controle ($p=0,0346$). O gene *phoR* codifica a proteína quinase sensora PhoR do TCS PhoRB. O ácido 3,4-DMB aumentou a expressão de *phoR* em aerobiose, enquanto em anaerobiose a expressão foi reprimida. Porém, em ambos os casos o efeito na expressão não foi estatisticamente significativo ($p=0,3866$ e $p=0,7202$). O ECP de *C. citroniae* teve um efeito na expressão do *phoR* com um perfil semelhante ao do EF, pois, assim como no EF, na presença do ECP de *C. citroniae* a expressão do *phoR* também foi reprimida em aerobiose e ativada em anaerobiose; porém, apesar da repressão na presença de ECP de *C. citroniae* ter sido estatisticamente significativa ($p=0,0013$), a ativação na presença de ECP de *C. citroniae* não o foi ($p=0,1509$), como mostra a Figura 10. PhoRB está envolvido na homeostase do fosfato e a quinase sensora PhoR é estimulada em condições de baixa concentração de fósforo inorgânico (Pi) (Pontes; Groisman, 2018).

Figura 26 - Expressão relativa do gene *phoR* (PhoRB) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

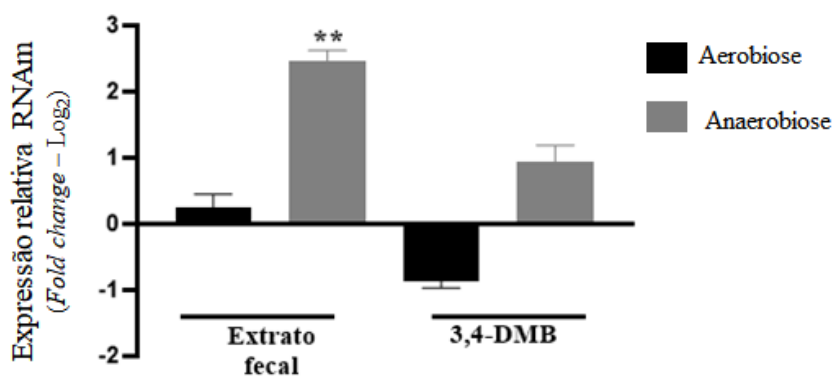


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. O EF e ECP de *C. citroniae* reprimem a expressão de *phoR* em aerobiose ($p=0,1861$ e $p=0,1861$, respectivamente) enquanto em anaerobiose ambos ativam a expressão do *phoR* ($p=0,0346$ e $p=0,7202$). O ácido 3,4-DMB não afetou significativamente a expressão de *phoR*. Os resultados representam a média de oito ($n=8$) culturas na presença de EF em aerobiose, ácido 3,4-DMB aerobiose e anaerobiose e ECP de *C. citroniae* em aerobiose e quatro ($n=4$) medições independentes para os outros casos.

5.3.2.7. Expressão relativa do gene quinase sensor *rscC* (TCS RcsBCD).

O TCS RcsBCD de *Salmonella* está implicado na regulação da síntese de cápsulas e flagelos. O TCS RcsBCD é um sistema complexo, não ortodoxo, que consiste no sensor transmembrana RcsC, no regulador de resposta fosfotransferase RcsB e na proteína transmembrana RcsD, considerada o intermediário da fosforilação entre RcsC e RcsB (Pescaretti *et al.*, 2013). RcsB fosforilado (RcsB-P), sozinho ou em combinação com outros reguladores, ativa a transcrição de uma ampla gama de genes, incluindo aqueles para síntese de cápsulas e algumas proteínas da membrana, e regula negativamente a síntese de flagelos. Além dos componentes dos genes codificadores do sistema RcsBCD mencionados acima, dois genes são necessários para a regulação adequada da atividade do RcsC. A lipoproteína RcsF atua como regulador positivo da RcsC e a IgaA atua como reguladora negativa e é epistática à RcsF (Majdalani; Gottesman, 2006). Avaliamos a expressão do gene *rscC*, que codifica a quinase sensora RcsC, na presença do EF e do ácido 3,4-DMB, tanto em aerobiose como em anaerobiose e nossos resultados mostraram que, com exceção do ácido 3,4-DMB em aerobiose, as outras condições aumentaram a expressão do *rscC*, com destaque para o aumento significativo (cerca de seis vezes em relação ao controle) na presença do EF em aerobiose, como mostra a figura 27.

Figura 27 - Expressão relativa do gene *rscC* (RcsBCD) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



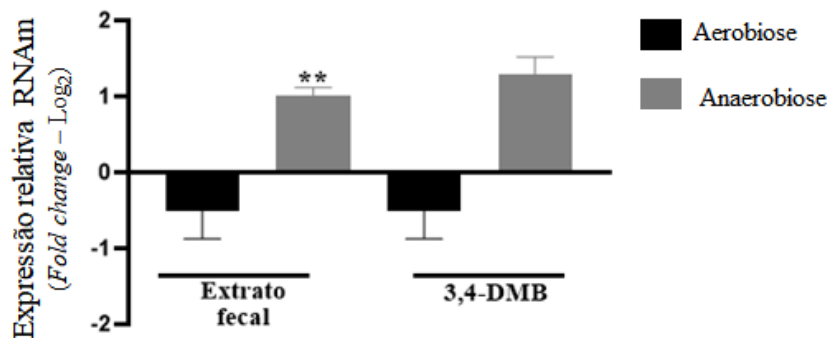
Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão do *rscC* foi ativada nas condições: EF (aerobiose e anaerobiose, $p= 0,5172$, $p=0,0007$, respectivamente) e ácido 3,4-DMB em anaerobiose ($p=0,1982$). A expressão foi reprimida na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose ($p= 0,1255$). Os resultados correspondem às médias de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.2.8. Expressão relativa do gene quinase sensor *ttrS* (TCS TtrSR).

Alguns gêneros de *Enterobacteriaceae* como, por exemplo, *Salmonella*, *Citrobacter* e *Proteus* são capazes de respirar o tetrionato, permitindo que se adaptem em ambientes competitivos nas quais as condições não são favoráveis. O *ttrRSBCA* é muito importante na capacidade dessas bactérias utilizarem tetrionato na respiração anaeróbica. O gene que codifica a enzima tetrionato redutase (*ttr*) está localizado no SPI-2. Os genes *ttrA*, *ttrB* e *ttrC* são os genes estruturais da tetrionato redutase. A transcrição dos genes do operon *ttrRSBCA* depende da regulação pelo TCS TtrSR (Hensel *et al.*, 1999).

Nossos resultados mostraram que, em condições de anaerobiose, a expressão do gene da HK *ttrS* foi ativada tanto na presença de EF como na presença do ácido 3,4-DMB e que essa ativação foi estatisticamente significativa na presença de EF. Em aerobiose a expressão do *ttrS* foi reprimida em ambos os casos acima mencionados, embora a repressão não foi significativa, como mostra a figura 28.

Figura 28 - Expressão relativa do gene *ttrS* (TtrSR) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



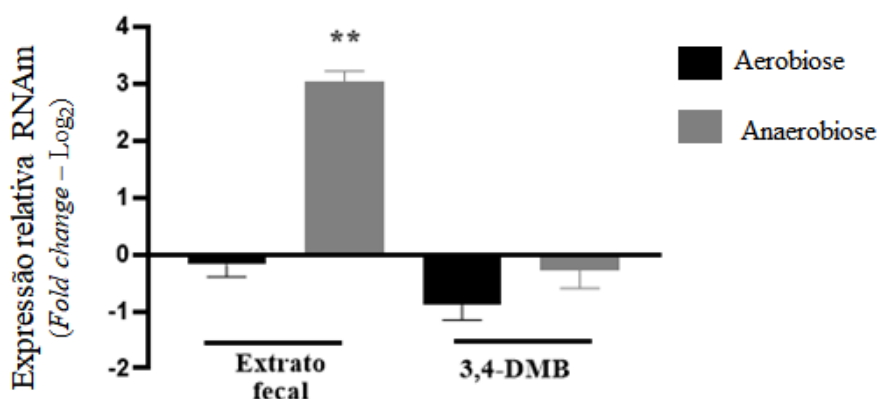
Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e ácido 3,4-DMB. A expressão do gene *ttrS* foi reprimida na presença de EF e ácido 3,4-DMB em aerobiose ($p=0,5880$, $p=0,5880$, respectivamente), enquanto em anaerobiose em ambas as condições a expressão foi ativada ($p=0,0061$, $p=0,0664$, respectivamente). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.2.9. Expressão relativa do gene quinase sensor *uhpB* (TCS UhpBA).

O TCS UhpBA controla a síntese do transportador de fosfato de hexose UhpT (transportador de fosfato de açúcar) em *E. coli*. O regulador de resposta UhpA ativa especificamente a transcrição do promotor UhpT em resposta a um evento de sinalização transmembranar mediado pela quinase sensora UhpB e a proteína UhpC (Island; Kadner, 1993;

Zhou *et al.*, 2003). A proteína reguladora UhpC tem similaridade em comprimento e topologia transmembranar e cerca de 30% de identidade de sequência de aminoácidos com a proteína UhpT e transportadores relacionados. Essa homologia levou à sugestão de que UhpC serve como um receptor para Glu6P de origem externa (Island; Kadner, 1993). A expressão do gene *uhpB* foi ativada significativamente na presença de EF em anaerobiose (cerca de oito vezes em relação ao controle). Nas outras condições avaliadas, EF em aerobiose e na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose, a expressão foi reprimida, mas de forma não significativa, como demonstrado na figura 29.

Figura 29 - Expressão relativa do gene *uhpB* (UhpAB) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ácido 3,4-DMB. A expressão de *uhpB* foi reprimida nas condições: EF (aerobiose, $p=0,7374$) e ácido 3,4-DMB (aerobiose e anaerobiose, $p=0,3806$ e $p=0,5895$, respectivamente). A expressão foi ativada na presença de EF (anaerobiose, $p=0,0011$). A expressão corresponde à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

5.3.3. Genes muito regulados

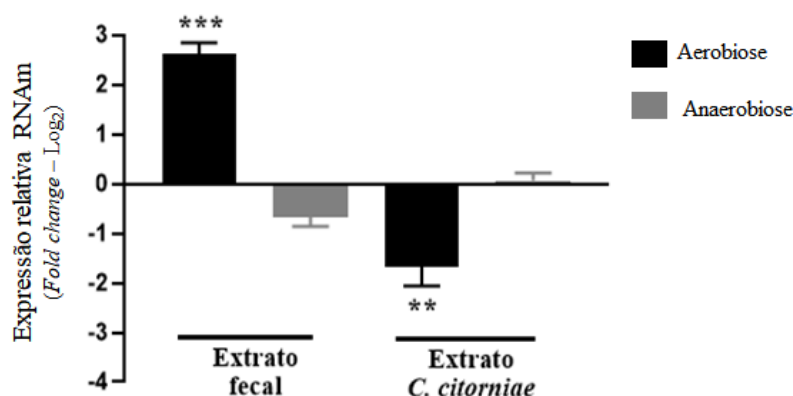
5.3.3.1. Expressão relativa do gene quinase sensor *citA* (CitAB).

Estudos com CitAB em *Salmonella* são escassos. Os trabalhos com mais ênfase neste TCS foram realizados em *K. pneumoniae*, onde foi demonstrado que CitAB induz a expressão dos genes *citC* e *cisS* sob condições anaeróbias na presença de íons citrato e sódio. Esses genes estão envolvidos na fermentação do citrato (Yamamoto *et al.*, 2008). Em *E. coli* foi mostrado que a fermentação do citrato requer a função de um contra-transportador de citrato/succinato codificado pelo gene *citT* e da citrato liase codificada pelo operon *citCDEFXG*. Semelhante à

K. pneumoniae, em *E. coli* CitA é a quinase sensora ligada à membrana e CitB o regulador de resposta (Scheu *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que a expressão do gene *citA* foi significativamente ativada na presença do EF em aerobiose. Já em anaerobiose sua expressão foi reprimida. Na presença do ECP de *C. citroniae* a expressão de *citA* foi reprimida em aerobiose de forma estatisticamente significativa e ligeiramente ativada em anaerobiose, como mostra a figura 30.

Figura 30 - Expressão relativa do gene *citA* (CitAB) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



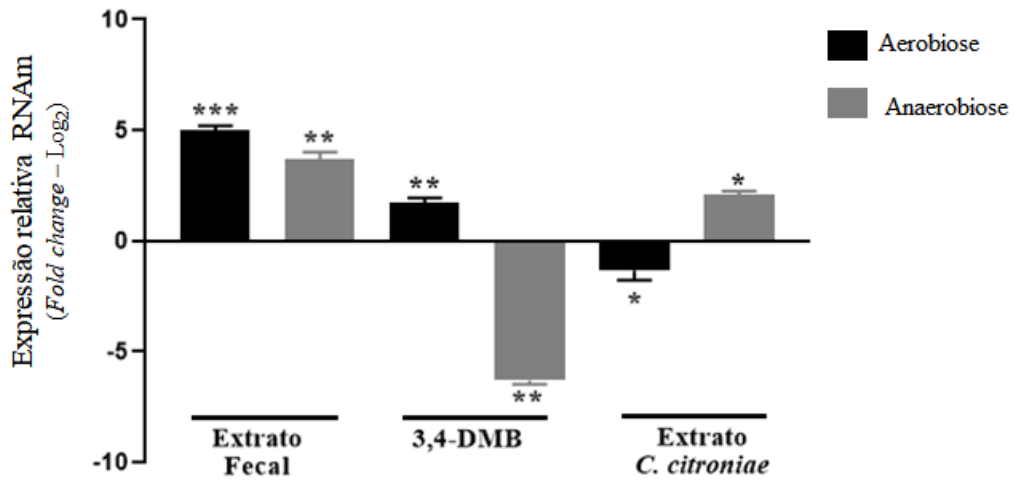
Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF e do ECP de *C. citroniae*. A expressão foi ativada na presença de EF em aerobiose ($p=0,0004$) e ECP de *C. citroniae* em anaerobiose ($p=0,9089$). Já na presença de EF em anaerobiose e ECP de *C. citroniae* em aerobiose a expressão foi reprimida ($p=0,11410$ e $p=0,0001$, respectivamente). Os resultados correspondem à média de 8 réplicas ($n=8$) na presença de EF e ECP de *C. citroniae* em aerobiose e 4 réplicas ($n=4$) na presença de EF e ECP de *C. citroniae* em anaerobiose.

5.3.3.2. Expressão relativa do gene quinase sensor *envZ* (EnvZ-OmpR).

A expressão do quinase sensor *envZ* do TCS EnvZ-OmpR foi significativamente afetada em todas as condições avaliadas. A expressão de *envZ* foi reprimida na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose e na presença de ECP de *C. citroniae* em aerobiose. Os valores de p foram 0,0098 e 0,0442, respectivamente. Nas demais condições, a expressão de *envZ* foi significativamente ativada quer em aerobiose quer em anaerobiose. Destaque maior foi para o aumento da expressão de *envZ* na presença do EF, tendo a expressão em aerobiose sido ativada em 30 vezes em relação ao controle ($p=0,0004$). Apesar do aumento não ter sido tão grande como em aerobiose, a expressão de *envZ* em anaerobiose na presença do EF também foi significativamente ativada, mais precisamente dez vezes em relação ao controle ($p=0,0099$). A expressão de *envZ* também foi significativamente ativada na presença do ácido 3,4-DMB em

aerobiose e na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose ($p=0,0055$ e $p=0,0117$, respectivamente), como mostra a figura 31.

Figura 31 - Expressão relativa do gene *envZ* (EnvZ-OmpR) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

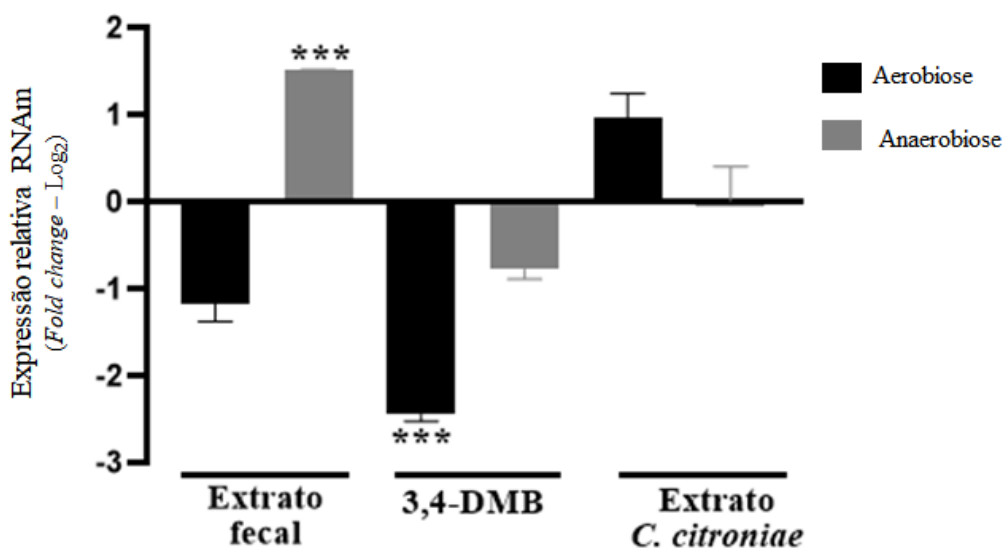


Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. Valores de p foram 0,0004, 0,0099, 0,0055, 0,0098, 0,0442, 0,0117, correspondente a expressão de *envZ* na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* em aerobiose e anaerobiose, respectivamente. Os resultados representam a média de oito ($n=8$) culturas na presença de EF em aerobiose, ácido 3,4-DMB aerobiose e anaerobiose e ECP de *C. citroniae* em aerobiose e quatro ($n=4$) medições independentes para os outros casos.

5.3.3.3. Expressão relativa do gene quinase sensor *phoQ* (TCS PhoPQ).

A expressão do gene *phoQ* que codifica o sensor HK PhoQ do TCS PhoPQ foi diferencialmente afetada na presença de EF, ECP de *C. citroniae* e na presença do ácido 3,4-DMB. A expressão foi significativamente ativada na presença de EF em anaerobiose ($p=0,001$) e de forma pouco significativa na presença de ECP de *C. citroniae* em aerobiose ($p=0,1747$). O HK teve sua expressão reprimida de forma significativa na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose ($p<0,0001$). Já o efeito repressivo do EF em aerobiose e do ácido 3,4-DMB em anaerobiose não foi estatisticamente significativo ($p=0,2857$ e $p=0,01621$, respectivamente). O nível de expressão de *phoQ* em cada condição pode ser observado na figura 32.

Figura 32 - Expressão relativa do gene *phoQ* (PhoPQ) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.

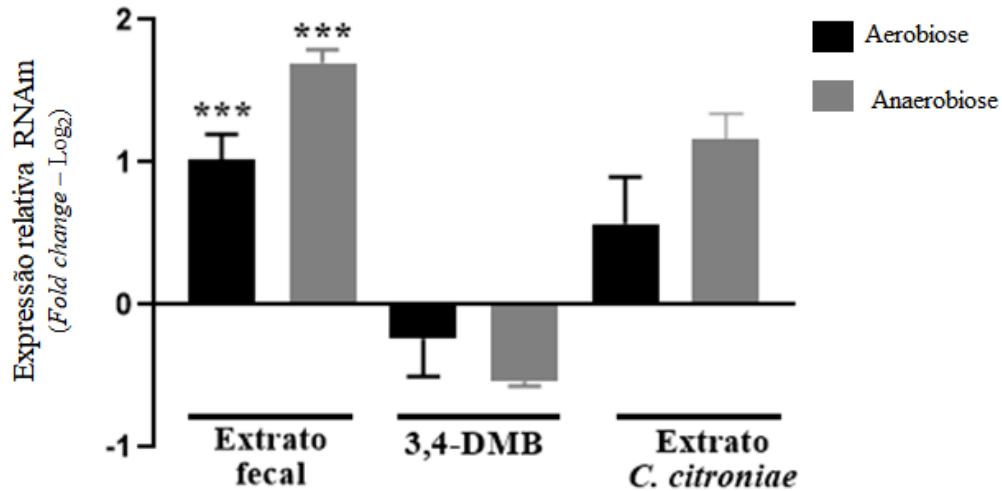


Legenda RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. *phoQ* foi reprimido na presença de EF (aerobiose, $p=0,2857$), ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose ($p<0,0001$ e $p=0,1621$, respectivamente) enquanto a expressão foi ativada na presença de EF em anaerobiose ($p=0,0010$) e ECP de *C. citroniae* ($p=0,1747$). Os resultados representam a média de oito ($n=8$) culturas na presença de EF em aerobiose, ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose e ECP de *C. citroniae* em aerobiose e quatro ($n=4$) medições independentes para os outros casos.

5.3.3.4. Expressão relativa do gene quinase sensor *qseC* (TCS QseCB).

O TCS QseCB é encontrado em várias espécies bacterianas e desempenha funções diversas e importantes para a adaptação e controle da densidade populacional de uma comunidade bacteriana no ambiente. Em *Salmonella*, QseCB é o principal sistema regulador do processo de *quorum sensing*, síntese de flagelos e formação de biofilmes (Ji *et al.*, 2017; Jimenez; Sperandio, 2019). Os resultados da avaliação da expressão gênica de *qseC* por PCR em tempo real mostraram que a expressão desta quinase sensora foi significativamente ativada na presença do EF, tanto em aerobiose como em anaerobiose ($p=0,0008$ e $p=0,0003$, respectivamente). É interessante destacar que, diferente do EF, a expressão do *qseC* na presença do ácido 3,4-DMB foi reprimida de forma não significativa, tanto em aerobiose como em anaerobiose ($p=0,4346$ e $p=0,2350$, respectivamente). O ECP de *C. citroniae* aumentou a expressão de *qseC* em anaerobiose; porém, este aumento não foi estatisticamente significativo ($p=0,0569$), como mostra a figura 33.

Figura 33 - Expressão relativa do gene *qseC* (QseCB) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. A expressão de *qseC* foi ativada na presença de EF em aerobiose e anaerobiose ($p=0,0008$ e $p=0,0003$, respectivamente) e na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose ($p=0,0569$), e reprimida na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose ($p=0,4346$ e $p=0,2350$, respectivamente). Os resultados representam a média de quatro ($n=4$) medições independentes, com exceção da cultura na presença do EF em aerobiose ($n=8$).

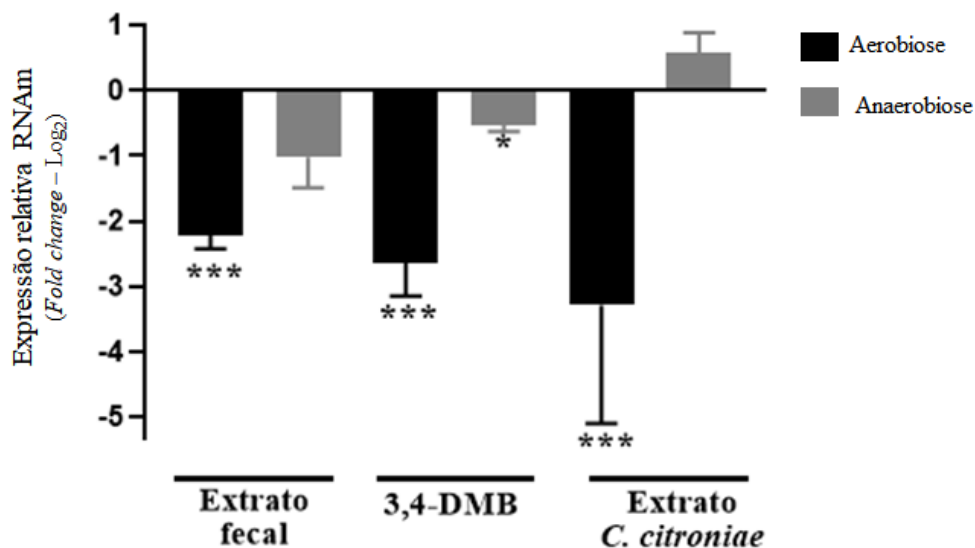
5.3.3.5. Expressão relativa do gene quinase sensor *ssrA* (TCS SsrAB).

Salmonella experimenta diferentes ambientes ao longo do processo infeccioso, desde a sua ingestão junto com alimentos contaminados até se estabelecer dentro dos vacúolos nas células epiteliais intestinais e macrófagos. Por disso, a bactéria muda constantemente o seu estilo de vida de forma a poder se adaptar ao ambiente externo em constante mudança. Um dos TCS importantes na mudança do estilo de vida de uma vida livre, munido de flagelos e consequentemente móvel, para um estilo de vida latente em forma de biofilme é o TCS SsrAB. Este TCS pertence à família do LuxR, sendo SsrA a quinase sensora que detecta o sinal, autofosforila e transfere o grupo fosforil a seu regulador de resposta cognato, SsrB. A expressão de *ssrAB* é rigorosamente regulada por múltiplos reguladores, entre os quais estão algumas proteínas de outros TCS, como por exemplo PhoP e OmpR (Feng *et al.*, 2003). Outras proteínas como SlyA, HilD e H-NS são importantes reguladores da expressão do TCS *ssrAB* (Fàbrega; Vila, 2013). A expressão de *ssrAB* é ainda autorregulada pelo SsrB, quando este é fosforilado por PhoP ou OmpR. O H-NS é um regulador negativo associado ao nucleóide e que atua como um fator transcricional global em muitas bactérias (Bustamante *et al.*, 2008; Banda *et al.*, 2019). O H-NS desempenha um papel importante durante a evolução da patogenicidade de *Salmonella*,

impedindo a expressão descontrolada do DNA adquirido por transferência horizontal (como os casos das SPI) e que poderia ser prejudicial ao condicionamento bacteriano caso não fossem rigorosamente regulados (Duong *et al.*, 2007; Lucchini *et al.*, 2006). Dois grupos de pesquisa, Lucchini *et al.*, (2006) e Navarre *et al.*, (2006) se propuseram a identificar todos os genes aos quais o H-NS se liga no genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, usando a tecnologia de imunoprecipitação em chip de cromatina (ChIP-onchip). Seus dados mostram ampla concordância e indicaram que o H-NS se liga a regiões do genoma de *S. typhimurium* com alto conteúdo de AT (característicos dos SPI). A descoberta de que o H-NS interage com extensos trechos de DNA nessas regiões levou a especulações sobre o papel dessa proteína na aquisição bem-sucedida desses genes de virulência.

O papel mais importante do TCS SsrAB é a de regular a expressão dos genes da SPI-2. Os genes SPI-2 codificam proteínas para a montagem da arquitetura do T3SS-2 e das proteínas efetoras injetadas por esse sistema no citoplasma da célula hospedeira para modular o ambiente e com isso conseguir sobreviver dentro de células fagocíticas, como macrófagos. Avaliamos por PCR em tempo real se o EF, o ECP de *C. citroniae* e o ácido 3,4-DMB afetava de alguma forma a expressão do gene *ssrA*, tanto para culturas feitas em aerobiose como em anaerobiose. Nossos resultados mostraram que, com exceção de culturas feitas na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose, em todas as outras condições a expressão de *ssrA* foi reprimida. A repressão da expressão foi estatisticamente significativa para as amostras cultivadas na presença de EF em aerobiose e na presença de ácido 3,4-DMB, tanto em aerobiose como em anaerobiose. A repressão também foi estatisticamente significativa na presença de ECP de *C. citroniae* em aerobiose, como mostra a figura 34.

Figura 34 - Expressão relativa do gene *ssrA* (SsrAB) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



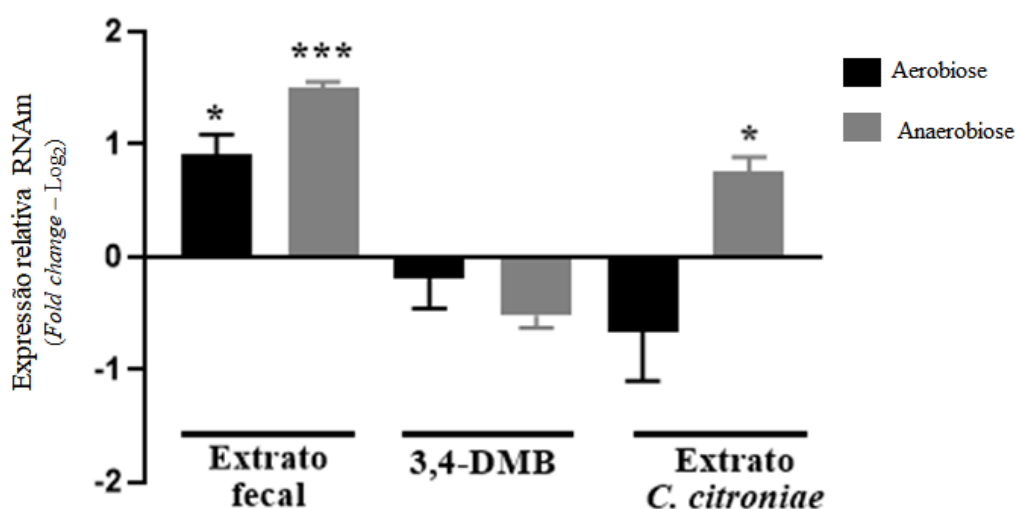
Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. Com exceção do ECP de *C. citroniae* em anaerobiose, que teve sua expressão ativada embora de forma não significativa ($p=0,3775$), nas condições EF em aerobiose, 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose e ECP de *C. citroniae* em aerobiose, a expressão foi significativamente reprimida ($p=0,002$, $p<0,0001$, $p=0,0102$ e $p=0,0002$, respectivamente), a repressão do *ssrA* na presença de EF em anaerobiose não foi significativo ($p=0,2266$). Os resultados correspondem à média de oito ($n=8$) amostras cultivadas na presença de ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*, e quatro ($n=4$), para as restantes amostras.

5.3.3.6. Expressão relativa do gene quinase sensor *torS* (TCS TorSR).

A estrutura, função e expressão do TCS TorSR estão bem caracterizados em *E. coli*. Esse TCS está envolvido, tanto em *E. coli* como em *Salmonella*, com o processo de respiração anaeróbica, regulando o operon *torACD*, que codifica o sistema óxido de trimetilamina (TMAO) redutase. Esse sistema permite a bactéria usar o TMAO como aceptor de elétrons alternativo para produzir energia (ANSALDI *et al.*, 2007; CAREY *et al.*, 2018). Estudos mostram que a expressão média de *torCAD* através de uma população de células é independente do oxigênio quando o TMAO está presente (Ansaldi *et al.*, 2007; Roggiani; Goulian, 2015). Nossos resultados mostram que o EF ativou a expressão do gene quinase sensor *torS*, de forma estatisticamente significativa, quando comparado ao controle, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose ($p=0,0179$ e $p<0,0001$). Comparando a expressão em aerobiose e em anaerobiose desse gene, o resultado é interessante, tendo em vista que independente da presença do oxigênio, o gene é expresso. Já na ausência de oxigênio, o EF induz uma expressão ainda maior de *torS*. A expressão de *torS* foi reprimida na presença do ácido 3,4-DMB, tanto em aerobiose ($p=0,5560$) como em anaerobiose, sendo nesse último de forma estatisticamente significativa

($p=0,0102$). A expressão também foi reprimida em aerobiose na presença do ECP de *C. citroniae*, embora de forma não significativa ($p=0,0801$). Porém, ainda assim configura-se um resultado interessante de se investigar, pois como mencionado acima, o estímulo para esse sensor encontra-se presente independente da presença de oxigênio. Em anaerobiose, a expressão de *torS* foi ativada, porém de forma não significativa ($p=0,1498$), como mostra a figura 35.

Figura 35 - Expressão relativa do gene *torS* (TorSR) de *Salmonella* avaliada por RT-PCR.



Legenda: RNA foi extraído de culturas crescidas até o meio da fase exponencial na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. A expressão de *torS* foi ativada na presença do EF em aerobiose e anaerobiose ($p=0,0179$ e $p<0,0001$, respectivamente) e na presença de ECP de *C. citroniae* em anaerobiose ($p=0,1498$). Já na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose e anaerobiose a expressão foi reprimida ($p=0,5560$ e $p=0,0102$, respectivamente), assim como na presença do ECP de *C. citroniae* em aerobiose ($p=0,0801$). Os resultados representam a média de oito ($n=8$, EF e ácido 3,4-DMB em aerobiose), seis ($n=6$, ácido 3,4-DMB em anaerobiose e ECP de *C. citroniae* em aerobiose) e quatro ($n=4$, EF e *C. citroniae* em anaerobiose) medições independentes.

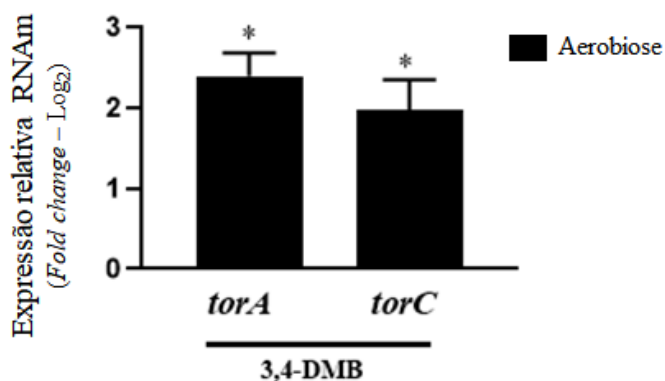
5.3.4. Expressão relativa dos genes do operon *torCAD*.

A diversidade fenotípica ajuda as populações a persistirem em ambientes em mudança e geralmente imprevisíveis. Uma estratégia geradora de diversidade é que os indivíduos alternem aleatoriamente entre estados fenotípicos, de modo que uma subpopulação tenha alta aptidão no ambiente atual e outra subpopulação tenha alta aptidão em um ambiente que possa ser encontrado no futuro. Essa “cobertura de apostas” biológicas pode ser encontrada em todos os domínios da vida. Bactérias como *E. coli* e *Salmonella* usam esse tipo de cobertura de apostas

biológicas quando expostas ao oxigênio e ao TMAO. Desta forma essas bactérias “apostam” na possibilidade de perda de oxigênio, devido a uma mudança brusca das condições do ambiente onde se encontram, e para estarem preparados para essa eventualidade, geram alta variabilidade de expressão do sistema respiratório TMAO (codificado pelo operon *torCAD*) de célula para célula. Se o oxigênio se esgotar rapidamente do ambiente, apenas as células que expressam o operon *torCAD* em níveis elevados podem continuar a crescer.

A expressão do *torCAD* nas células de *E. coli* flutua rapidamente durante o crescimento aeróbico na presença de TMAO, resultando em uma ampla distribuição da expressão na população. Nossos resultados mostraram que na presença do ácido 3,4-DMB a expressão de dois dos genes do operon *torCAD* foram significativamente ativadas como mostra a Figura 36.

Figura 36 – Expressão relativa dos genes do operon *torCAD* na presença de ácido 3,4-DMB.



Legenda: Culturas de *Salmonella* foram realizadas na ausência ou presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose. A expressão dos genes do operon *torCAD*, (*torA* e *torC*) foi ativada de forma estatisticamente significativa ($p=0,0128$ e $p=0,0491$, respectivamente). Os resultados correspondem à média de quatro ($n=4$) medições independentes.

Na Tabela 4 fizemos um resumo com os resultados do RT-PCR dos genes HK dos TCS de *Salmonella* cultivados em aerobiose e anaerobiose na presença do EF, ECP de *C. citroniae* e do ácido 3,4-DMB. Na tabela, A, corresponde a expressão do gene ativada, R, corresponde a expressão reprimida, asterisco a frente das letras A ou R, refere-se ao nível de significância a que a expressão do gene em causa foi afetada, *ns* indica que embora a expressão do gene tenha sido afetada, o efeito não foi estatisticamente significativo. Alguns genes, não tiveram suas expressões avaliadas em condições de presença de 3,4-DMB ou ECP de *C. citroniae*, nesses casos, as células da tabela correspondente encontram-se de cor cinza.

Tabela 4 – Resumo da expressão dos genes HK nas diferentes condições.

Gene sensor quinase	Extrato fecal		Ácido 3,4-DMB		Extrato <i>C. citroniae</i>		
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose	
<i>arcB</i>	A (ns)	A (ns)					Pouco regulados
<i>barA</i>	A (ns)	A (ns)	R (ns)	R (ns)			
<i>baeS</i>	R (ns)	A (ns)	R (ns)	R (ns)	A (ns)	R (ns)	
<i>basS</i>	A (ns)	R (ns)					
<i>dcuS</i>	A (ns)	R (ns)	R (ns)	R (ns)			
<i>glrK</i>	R (ns)	R (ns)		R (ns)			
<i>hydH</i>	R (ns)	A (ns)		R (ns)			
<i>kdpD</i>		R (ns)			R (ns)	A (ns)	
<i>pgtB</i>	R (ns)	R (ns)		R (ns)			
<i>rstB</i>	A (ns)	A (ns)			R (ns)	A (ns)	
<i>tctE</i>	R (ns)				R (ns)	A (ns)	
<i>creC</i>	A*	R (ns)	R (ns)	R (ns)	R*	A*	
<i>cheA</i>	R (ns)	R (ns)				A*	
<i>cpxA</i>	A (ns)	A**				A (ns)	
<i>glnG</i>	R (ns)	R (ns)		R*			
<i>narQ</i>	R (ns)	A**	R (ns)	R (ns)			
<i>narX</i>	A (ns)	R*	R (ns)	R (ns)			
<i>phoR</i>	R (ns)	A**	A (ns)	R (ns)	R**	A (ns)	
<i>rscC</i>	A (ns)	A**	R (ns)	A (ns)			
<i>ttrS</i>	R (ns)	A**	R (ns)	A (ns)			
<i>uhpB</i>	R (ns)	A**	R (ns)	R (ns)			
<i>citA</i>	A***	R (ns)	R**	A (ns)			Muito regulados
<i>envZ</i>	A***	A**	A**	R**	R**	A*	
<i>phoQ</i>	R (ns)	A***	R***	R (ns)	A (ns)	A (ns)	
<i>qseC</i>	A***	A***	R (ns)	R (ns)	A (ns)	A (ns)	

<i>ssrA</i>	R ^{***}	R (<i>ns</i>)	R ^{***}	R [*]	R ^{***}	A (<i>ns</i>)	
-------------	------------------	-----------------	------------------	----------------	------------------	-----------------	--

Legenda: A tabela mostra os resultados da expressão dos genes HK dos TCS. As células sombreadas de cor cinza referem à condição em que a expressão de alguns genes não foi avaliada. **A** – Expressão gênica ativada; **R** – expressão gênica reprimida; *ns* – expressão afetada de forma não significativa; *, **, *** - expressão afetada de forma significativa; células cinza – não foi feito RT-PCR

5.4. Genes diferencialmente regulados pelo ácido 3,4-DMB em aerobiose (transcriptoma).

A fim de ter um perfil dos genes afetados pelo ácido 3,4-DMB em aerobiose, *Salmonella* foi cultivada por quatro horas a 37 °C na ausência e na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose. RNA dessas amostras foi extraído, tratado, purificado e submetido a sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos de Nova Geração da Fundação Oswaldo Cruz, usando tecnologia Illumina. Esses experimentos foram realizados em conjunto com Eduardo de Souza Alves, que recentemente obteve seu M.Sc. em nosso grupo. A descrição detalhada destes experimentos encontra-se na sua dissertação de mestrado, e por isso os detalhes destes ensaios não foram incluídos nesta tese. Gerou-se uma grande quantidade de dados que foram analisados minuciosamente e foram selecionados genes que tiveram suas expressões ativadas ou reprimidas em duas vezes ou mais. Como mostra a Tabela 5 -, 35 genes tiveram sua expressão ativada pelo ácido 3,4-DMB, com destaque para os genes *torC*, *torA* e *torD* que tiveram suas respectivas expressões ativadas 122, 72 e 65 vezes em relação ao controle. Em relação aos genes que tiveram sua expressão reprimida, contabilizou-se um total de 94 genes. Podemos destacar que muitos dos genes reprimidos fazem parte das duas SPI com maior importância para processos de virulência de *Salmonella*, SPI-1, responsável pelo processo de invasão, e SPI-2, responsável pelo processo de sobrevivência em células hospedeiras.

Tabela 5 - Genes diferencialmente regulados pelo ácido 3,4-DMB.

Gene	Regulação ^a	Anotação
<i>Genes ativados por ácido 3,4-DMB</i>		
RS09715	NA ^b	tRNA-Leu
RS11460	NA ^b	Proteína da família DinI
RS03415	NA ^b	tRNA-Gln
RS19680	122,7	Citocromo TorC do tipo penta-heme
RS19675	72,3	Trimetilamina-N-óxido redutase TorA
RS19670	65,1	Chaperone TorD
RS17360	4,5	Proteína contendo domínio DUF1471
RS17380	3,8	Subunidade da bomba de efluxo do ácido p-hidroxibenzóico AaeA
RS20565	3,3	Proteína hipotética
RS08640	3,2	Proteína contendo domínio semelhante à ferritina
RS07550	3,2	Proteína periplásmica reguladora da resistência a múltiplos antibióticos MarB

RS08650	3,1	Catalase
RS08645	3,1	Proteína contendo domínio semelhante à ferritina
RS19665	3,0	Citocromo-c peroxidase
RS25500	3,0	Proteína hipotética
RS17375	3,0	Subunidade da bomba de efluxo do ácido p-hidroxibenzóico AaeA
RS08635	2,9	Proteína hipotética
RS07560	2,9	Regulador transcricional da família MarR
RS07520	2,8	Proteína hipotética
RS07555	2,7	Ativador transcricional MarA da bomba de resistência a múltiplas drogas AcrAB
RS26075	2,6	Transposase
RS12305	2,6	Proteína hipotética
RS07790	2,5	Proteína bdm
RS07605	2,4	Fosfoporina PhoE
RS26500	2,4	Proteína hipotética
RS03950	2,4	proteína associada à bomba de efluxo de múltiplas drogas, família AcrZ
RS25850	2,4	Proteína hipotética
RS18765	2,4	Proteína fimbrial polar longa LpfA
RS07915	2,3	Proteína hipotética
RS18805	2,3	Regulador de transcricional
RS03845	2,2	Proteína hipotética
RS14470	2,1	Proteína de ligação ao peptidoglicano LysM
RS09920	2,1	Proteína hipotética
RS01845	2,0	Subunidade I do citocromo ubiquinol oxidase I
RS19300	2,0	Permeasse de xantina
RS13860	2,0	Proteína de repetição de domínio semelhante a Ig
RS16530	2,0	Regulador de composição da superfície celular GlgS
RS02890	2,0	Fosfo-açucar isomerase

Genes reprimidos por ácido 3,4-DMB

<i>pagD</i>	-32,6	Proteína de virulência PagD
<i>pagC</i>	-25,4	Proteína de virulência de virulência PagC
RS07980	-21,8	Proteína hipotética
RS07975	-20,3	Proteína hipotética
RS06300	-7,5	Mutase chorismate
<i>virK</i>	-7,5	Proteína de localização VirG VirK
RS14395	-6,9	Proteína de resistência antimicrobiana Mig-14
RS21855	-6,9	Proteína de quimiotaxia acceptor de metil
RS09315	-6,3	Proteína B de formação de ligação dissulfeto
<i>ssaH</i>	-6,2	Proteína T3SS SsaH
<i>ssaJ</i>	-6,1	Lipoproteína SsaJ do aparelho SPI-2 T3SS
<i>sseA</i>	-5,9	Chaperona T3SS de SPI-2 SseA

RS08160	-5,8	Metiltransferase dependente de SAM classe I
RS21860	-5,4	Proteína da família TolC
RS07005	-5,2	Proteína hipotética
RS06910	-5,1	Regulador da resposta de ligação ao DNA (fosforilado por SsrA)
RS21850	-5,0	Proteína hipotética
RS21865	-4,9	Subunidade adaptadora periplásmica de secreção da família HlyD tipo I
RS06610	-4,8	Endonuclease inespecífica de DNA/RNA
RS21870	-4,6	Proteína de membrana
RS21875	-4,5	Proteína de ligação ao ATP do transportador de antibióticos ABC
<i>mgtC</i>	-4,2	Proteína MgtC
RS10000	-4,1	Proteína hipotética
<i>sifB</i>	-4,1	Proteína efetora SifB do T3SS de SPI-2
<i>spiA</i>	-4,0	Proteína SpiA do T3SS de SPI-2
<i>pagO</i>	-4,0	Proteína PagO
<i>ssaK</i>	-3,9	Proteína SsaK do Aparelho T3SS de SPI-2,
RS12285	-3,8	Protease E de membrana externa
<i>ssaR</i>	-3,8	Proteína SsaR aparelho de exportação do T3SS de SPI-2
<i>pipB2</i>	-3,8	Proteína efetora PipB2 do T3SS de SPI-2
RS06915	-3,7	Sensor híbrido histidina quinase /regulador de resposta
RS08345	-3,6	Proteína hipotética
RS16200	-3,6	Proteína hipotética
<i>ssaD</i>	-3,4	Proteína SsaD do T3SS
RS07695	-3,4	S-adenosilmetionina: tRNA ribosiltransferase-isomerase
<i>sseB</i>	-3,3	Proteína de translocação SseB do T3SS de SPI-2
RS22170	-3,3	Fosfatase ácida não específica
RS16205	-3,3	Amidohidrolase
<i>pagN</i>	-3,1	Proteína PagN da membrana externa
<i>pipB</i>	-3,1	Proteína efetora PipB do T3SS de SPI-2
RS01260	-3,0	RNA ribossomal 16S
RS09705	-3,0	Hidrolase associada à parede celular
RS09710	-3,0	Proteína de membrana
RS23105	-3,0	Proteína hipotética
RS20025	-2,9	RNA ribossomal 16S
RS25775	-2,9	Proteína hipotética
RS21220	-2,9	RNA ribossomal 16S
<i>sopD2</i>	-2,9	Proteína efetora SopD2 do T3SS de SPI-2
RS07675	-2,9	Proteína regulada por PhoPQ
RS20495	-2,9	RNA ribossomal 16S
RS21440	-2,8	RNA ribossomal 16S
<i>steB</i>	-2,7	Proteína efetora SteB do T3SS de SPI-2
RS20510	-2,5	RNA ribossomal 23S

RS21450	-2,5	RNA ribossomal 23S
RS21235	-2,5	RNA ribossomal 23S
RS06180	-2,5	Inibidor da lisozima
RS20035	-2,5	RNA ribossomal 23S
<i>torR</i>	-2,4	TorR, regulador de resposta do sistema de dois componentes TorSR
RS17550	-2,4	RNA ribossomal 16S
RS01275	-2,4	RNA ribossomal 23S
RS13645	-2,4	RNA ribossomal 23S
RS25220	-2,4	Proteína hipotética
RS06950	-2,3	Chaperona de T3SS da família CesD/SycD/LcrH
<i>sopD</i>	-2,3	Proteína efetora SopD do T3SS de SPI-1
RS26870	-2,3	Proteína hipotética
RS17540	-2,3	RNA ribossomal 23S
RS15705	-2,3	Proteína contendo domínio DUF1460
RS13655	-2,3	RNA ribossomal 16S
<i>stdA</i>	-2,3	proteína fimbrial StdA
RS22135	-2,3	Proteína hipotética
RS07970	-2,3	D-alanil-D-alanina dipeptidase
<i>sopB</i>	-2,3	Proteína efetora SopB inositol fosfato fosfatase do T3SS de SPI-1
<i>sigE</i>	-2,3	Chaperona SigE do T3SS
RS04570	-2,3	Subunidade transportadora de macrólidos MacA
RS06120	-2,3	Proteína contendo domínio DUF3626
RS22150	-2,3	Regulador Transcricional da família AraC
RS09255	-2,2	Proteína fosfatase 1 de serina/treonina-
<i>sseD</i>	-2,2	Proteína translocação SseD do T3SS de SPI-2
<i>Sopé</i>	-2,2	Fator de troca de nucleotídeos de guanina SopE do T3SS de SPI-1
RS08475	-2,2	Proteína efetora quinase SteC do T3SS de SPI-2
RS06140	-2,2	Lipoproteína
RS14935	-2,1	Proteína SipB do complexa da ponta da agulha do T3SS de SPI-1
RS10700	-2,1	UDP-glicose 6-desidrogenase
RS26740	-2,1	Proteína hipotética
RS09270	-2,1	Proteína contendo domínio DUF1398
RS04050	-2,1	Efetora E3de ubiquitina transferase SlrP de T3SS de SPI-1
RS06955	-2,1	Proteína de Translocação SseC do T3SS de SPI-2
RS17930	-2,1	Subunidade maior de nitrito redutase
RS05535	-2,1	Proteína de inanição de fosfato PhoH
RS14925	-2,1	Proteína SipD do complexa do T3SS de SPI-1
RS25405	-2,0	Proteína hipotética
RS20890	-2,0	CDP-diacilglicerol pirofosfatase
RS14930	-2,0	Proteína SipC do complexa do T3SS de SPI-1

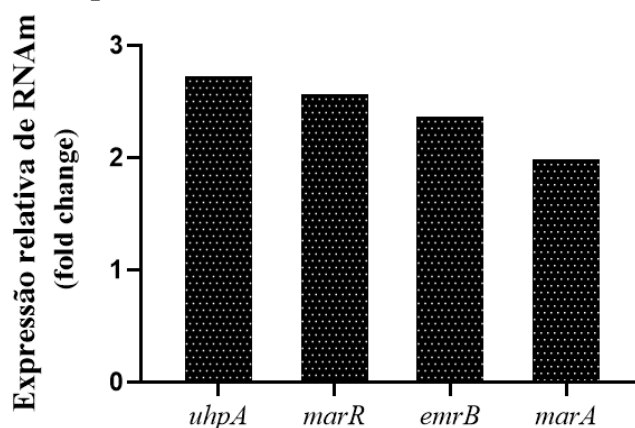
RS00415	-2,0	Proteína hipotética
---------	------	---------------------

^a $p < 0.05$. ^b Genes detectados apenas na presença do ácido 3,4-DMB.

5.5. Genes diferencialmente regulados pelo EF em anaerobiose (transcriptoma).

Os resultados de sequenciamento de RNAm de *Salmonella* cultivadas na presença de EF em anaerobiose, mostraram que genes importantes para virulência dessa bactéria foram significativamente regulados. Como forma de ver quais os genes cuja expressão foi regulada de forma mais significativa, agrupamos os genes cujo nível de expressão foi ativado ou reprimido dois ou mais vezes em relação ao controle. Os resultados mostraram que, 83 genes foram ativados com esse perfil enquanto um número bem maior de genes tiveram expressão reprimida com dois ou mais vezes em relação ao controle, um total de 255 genes. Os resultados mostraram que, dentre os genes que foram ativados, foram encontrados genes que codificam proteínas que estão envolvidos com resistência a antibióticos, como são os casos dos genes *marA* (ativador transcricional da bomba de efluxo de resistência a múltiplas antibióticos AcrAB - MarA), *marR* (regulador transcricional de resistência múltipla a antibióticos - MarR) e *emrB* (Subunidade do transportador permease da família MFS de efluxo de múltiplos antibióticos - EmrB). Para além destes genes, o gene *uhpA* (codifica o regulador de resposta UhpA do TCS UhpAB) também teve sua expressão gênica ativada, como mostra a figura 37.

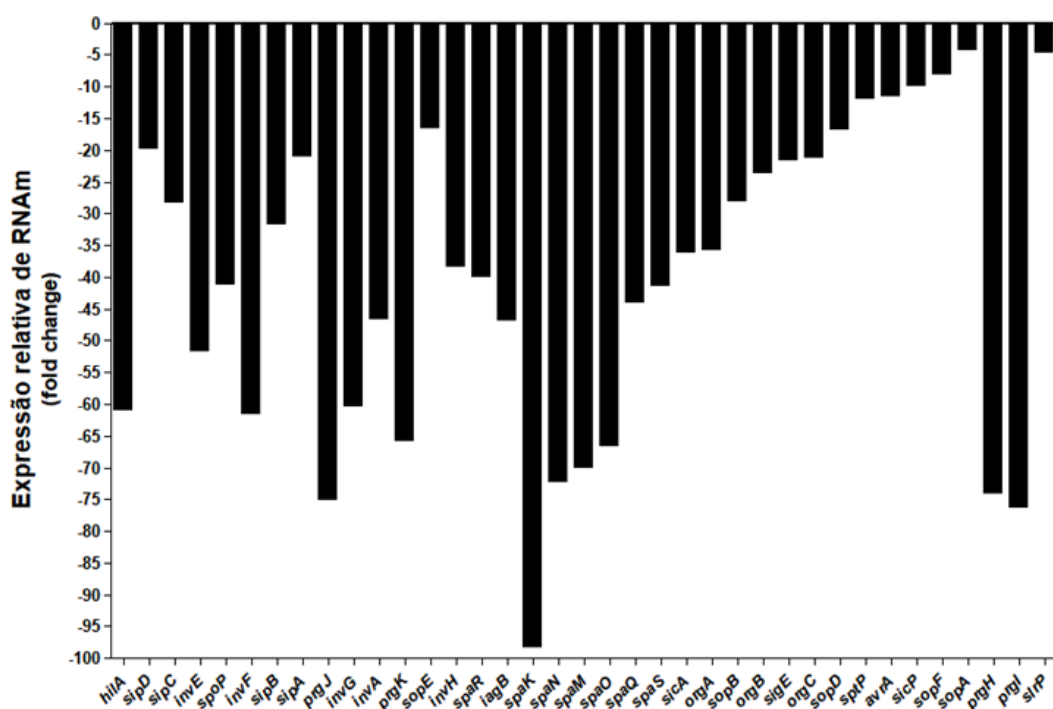
Figura 37 - Genes ativados pelo EF em anaerobiose.



Legenda: Três genes envolvidos com a regulação da resistência a múltiplos antibióticos, *marR*, *emrB* e *marA* e o gene *uhpA*, RR do TCS UhpAB, tiveram suas respectivas expressões gênicas ativadas na presença do EF. As barras representam o número de vezes que a expressão foi ativada em comparação ao controle.

Dos genes, cuja expressão foi reprimida, 38 (14,9%) são genes codificados dentro do SPI-1 ou fazem parte do T3SS-1 (figura 38). Alguns desses genes foram reprimidos mais de 60 vezes comparado ao seu controle, como são os casos dos genes *hilA*, *prgL*, *prgJ*, *prgK*, *prgH*, *spaK*, *spaN*, *spaM* e *spaO*, todos esses genes codificam proteínas que estão diretamente envolvidos com o processo de invasão da *Salmonella* às células epiteliais intestinais (figura 38).

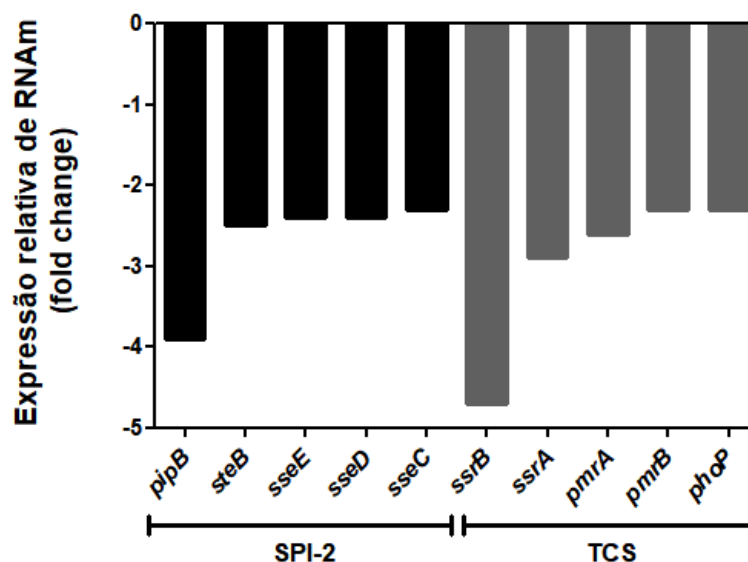
Figura 38: Genes SPI-1 e T3SS-1 reprimidos pelo EF em anaerobiose.



Legenda: Trinta e oito genes, codificados dentro do SPI-1 e outros que codificam proteínas do T3SS-1, tiveram suas expressões reguladas pelo EF. O gene *hilA*, que codifica o HilA, regulador mestre da expressão e atividade do SPI-1 teve sua expressão reprimida 60 vezes em relação ao controle. Os valores no eixo do X representam o número de vezes (*fold change*) que a expressão de um gene foi regulada (reprimida) em relação ao seu controle, em que *Salmonella* foi cultivada na ausência de estímulos do EF.

Cinco genes codificados dentro do SPI-2, *pipB*, *steB*, *sseE*, *sseD* e *sseC*, e, cinco genes do TCS, *pmrA* (*basS*) e *pmrB* (*basR*), sensor quinase e regulador de resposta do TCS PmrAB (BasSR), respectivamente, *phoP* (regulador de resposta do TCS PhoPQ), *ssrB* e *ssrA* (regulador de resposta e sensor quinase do TCS SsrAB, respectivamente) foram reprimidos pelo EF em anaerobiose como mostra o gráfico da figura 39.

Figura 39 – Genes SPI-2 e TCS reprimidos pelo EF em anaerobiose

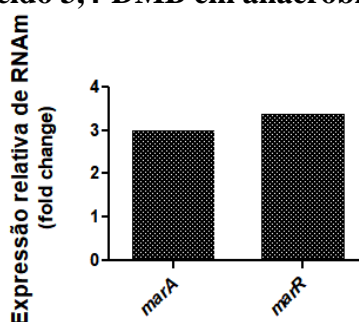


Legenda: Genes codificados dentro do SPI-2 e genes do TCS reprimidos na presença do EF em anaerobiose. As barras pretas correspondem o número de vezes que genes do SPI-2 enquanto as barras cinza correspondem ao número de vezes que genes TCS foram reprimidos comparados os respectivos controles.

5.6. Genes diferencialmente regulados pelo ácido 3,4-DMB em anaerobiose (transcriptoma).

Os resultados de sequenciamento do RNA mensageiro de *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose, mostrou que esse composto regulou, diferencialmente, a expressão de muitos genes importantes para o processo de virulência de *Salmonella*. Muitos genes foram ativados, sendo 60 destes, tiveram suas expressões ativadas duas vezes ou mais em relação aos respectivos controles. E desses genes que, tiveram suas expressões significativamente ativados destacamos 3 genes que estão envolvidos com a resistência a múltiplos antibióticos, *marA* e *marR*, como mostra a figura 40.

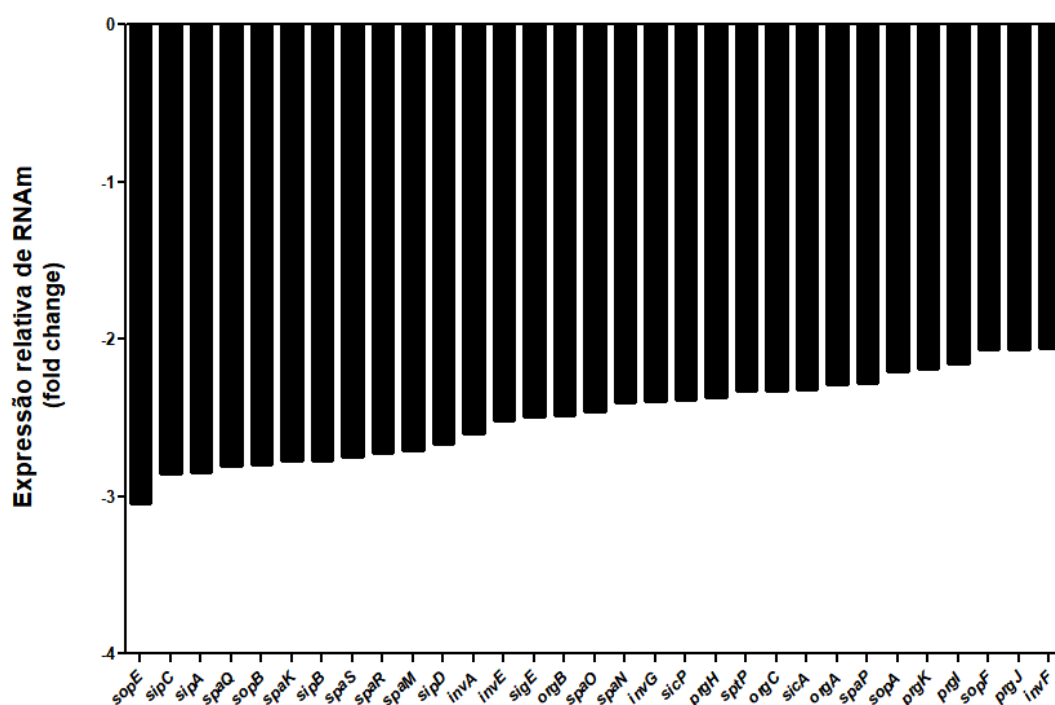
Figura 40 – Genes ativados pelo ácido 3,4-DMB em anaerobiose



Legenda: Genes envolvidos com a resistência a múltiplos antibióticos, *marA* e *marR*, tiveram suas expressões ativadas pelo ácido 3,4-DMB. As barras mostram o número de vezes que a expressão gênica foi ativada em relação ao controle.

Dos genes que tiveram suas expressões significativamente regulados, encontramos 91 que, foram reprimidos duas vezes ou mais em relação ao controle, quando *Salmonella* foi cultivada na presença do ácido 3,4-DMB. Dentre os genes reprimidos, destacamos os genes que são codificados dentro do SPI-1 ou que codificam proteínas estruturais ou efetoras do T3SS-1, todos envolvidos com o processo de invasão das células epiteliais intestinais do hospedeiro. Os resultados da expressão gênica desses genes são mostrados no gráfico da figura 41.

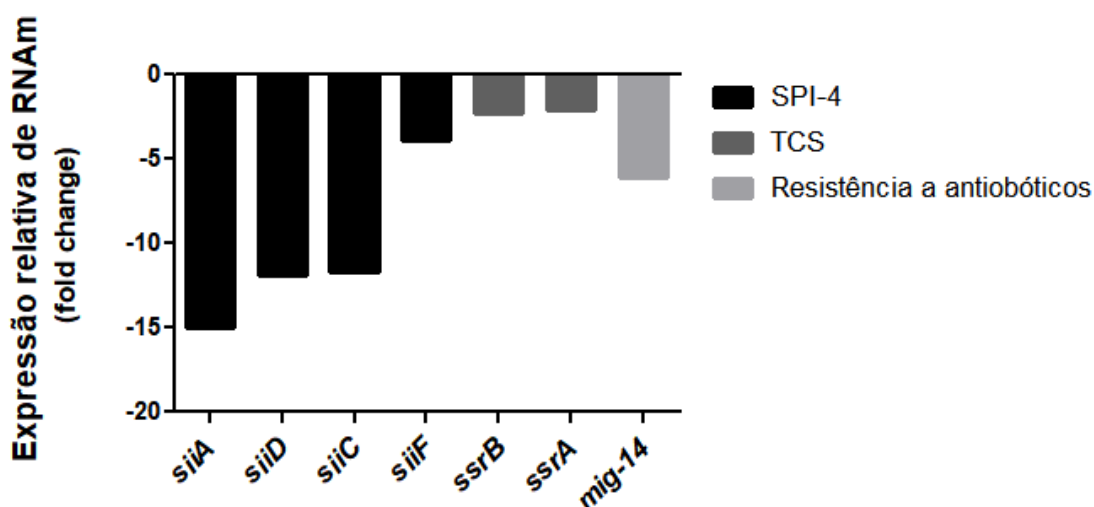
Figura 41: Genes SPI-1 e T3SS-1 reprimidos pelo ácido 3,4-DMB em anaerobiose.



Legenda: Trinta e três genes, codificados dentro do SPI-1 e outros que codificam proteínas do T3SS-1 foram reprimidos em *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose. A maior parte dos genes tiveram suas expressões reprimidas duas e até três vezes em relação aos controles.

Dos genes que tiveram suas expressões significativamente reprimidas, destacamos aqui também quatro genes codificados dentro do SPI-4 (*siiA*, *siiC*, *siiD* e *siiF*) que está envolvido com a regulação do processo de adesão da bactéria. O gráfico da figura 42, também mostra os genes *ssrA* e *ssrB*, do TCS SsrAB, bem como o gene *mig-14* que codifica uma proteína envolvida com a resistência a antibióticos que, foram reprimidas pela ação do ácido 3,4-DMB em anaerobiose.

Figura 42: Genes SPI-4, TCS e *mig-14* reprimidos pelo ácido 3,4-DMB em anaerobiose



Legenda: Genes SPI-4 (barras pretas), *ssrA* e *ssrB* do TCS SsrAB (barras cinzas escuras) e *mig-14* (barra cinza clara) reprimidos de forma significativa pelo ácido 3,4-DMB. Os genes SPI-4 foram reprimidos mais de 10 vezes em relação ao controle.

5.7. Comparação dos nossos resultados de RNAseq com outras bases de dados disponíveis.

Vários trabalhos usando a abordagem de transcriptoma (RNAseq) para avaliar a expressão gênica de *Salmonella* foram publicados na última década. Quisemos comparar o perfil de expressão de genes de *Salmonella* na presença do ácido 3,4-DMB cultivadas em aerobiose (Tabela 4) com trabalhos de RNAseq de *Salmonella* submetida a outros estímulos. Desta forma, selecionamos três trabalhos: um publicado em 2013 por Kroger e colaboradores em que expuseram *Salmonella* a um total de 22 estímulos (disponível no anexo 1) que mimetizam as condições pelas quais essa bactéria passa durante o seu processo infeccioso; um trabalho publicado por Antunes e colaboradores em 2014 em que submeteram *Salmonella* a crescimento sob os estímulos do EF e sequenciaram o RNA no sentido de avaliar os efeitos do

EF na expressão gênica total de *Salmonella*; e, finalmente, um trabalho publicado em 2019 por Rocío Canals e colaboradores, em que comparam a expressão gênica de duas cepas de *Salmonella* geneticamente semelhantes expostas a 16 estímulos que mimetizam as condições encontradas pela bactéria durante o processo infeccioso (disponível no anexo 2).

Grande parte (dez) dos estímulos a que *Salmonella* foi submetida nos trabalhos realizados por Kröger *et al.* (2013) e Canals *et al.* (2019) envolvem pequenos choques ambientais induzidos pela transferência da bactéria para meios sob efeito de estímulos como, por exemplo: temperatura de 15 °C; temperatura de 25 °C; pH 5,8 (ácido leve); pH 3 (ácido forte); choque por sais biliares; osmolaridade alta; ausência completa de oxigênio, limitação de Fe²⁺; choque por peróxido (H₂O₂) e choque por óxido nítrico (NO). Nestes experimentos, culturas de *Salmonella* foram submetidas a essas condições por um tempo de 10-20 minutos. O efeito na expressão gênica de bactérias cultivadas nessas condições reflete as respostas imediatas da bactéria na tentativa de se adaptar a essas diferentes condições de estresse.

Para uma análise comparativa dos genes de virulência de *Salmonella* importantes principalmente para a capacidade de invasão de células epiteliais intestinais e sobrevivência em macrófagos. Fizemos uma lista, a partir dos nossos resultados de RNAseq de *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB, com todos os genes envolvidos na invasão de células epiteliais intestinais (genes do SPI-1), todos os genes envolvidos na sobrevivência no interior dos macrófagos (genes SPI-2), bem como seus respectivos reguladores de expressão, que tiveram suas expressões gênicas afetadas de alguma forma (ativadas ou reprimida). Fizeram parte dessa lista, genes do TCS que também tiveram suas expressões ativadas. Com isso, fomos ver e comparar a expressão desses genes listados nas condições a que a *Salmonella* foi cultivada nos três estudos citados acima. Os genes codificados no SPI-1 que foram afetadas pelo ácido 3,4-DMB (nossos resultados) e consequentemente fizeram parte da nossa lista estão os seguintes: *sopD*, *sopE2*, *sopB*, *sopE*, *slrP*, *sipD* e *sipC*. Esses genes codificam proteínas que estão envolvidas com a invasão de células epiteliais, rearranjos do citoesqueleto de actina e internalização das bactérias (Fàbrega: Vila, 2013). O gene *hilA* que codifica o regulador mestre das SPI-1 também foi afetada e fez parte da nossa lista. Os genes codificados no SPI-2 que foram afetados pelo ácido 3,4-DMB em aerobiose (nossos resultados) estão os seguintes: *ssaH*, *ssaJ*, *sseA*, *sifB*, *sipA*, *ssaR*, *pipB2*, *sseD*, *sseB*, *pipB*, *sopD2*, *steB*, *sseD*, *steC*, *ssaD* e *sseC*. Esses codificam proteínas que estão envolvidas com a montagem do T3SS-2, transportadores de proteínas, proteínas efetoras e chaperonas (Fàbrega: Vila, 2013). O mapa genômico dos genes codificados no SPI-1 e SPI-2 são mostrados na Figura 36. Além dos genes listados acima

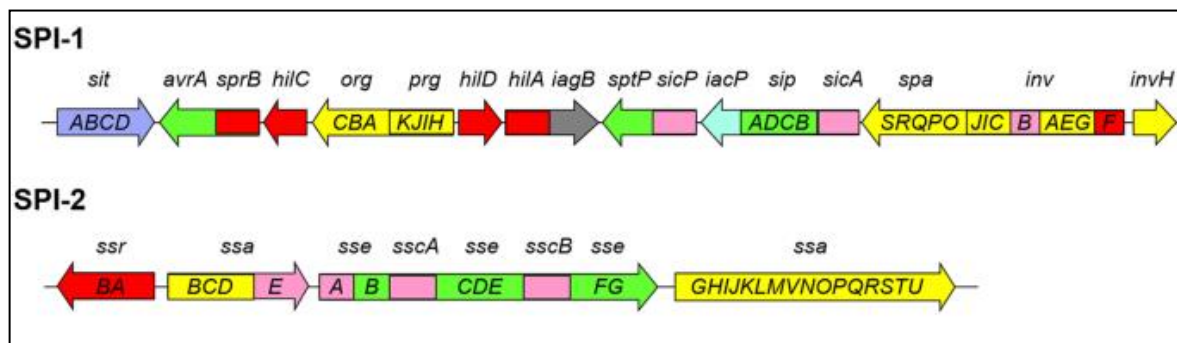
(genes do SPI-1, *hilA* e SPI-2), alguns genes do TCS também foram afetadas e fizeram parte da nossa lista. E, os genes do TCS afetados pelo ácido 3,4-DMB em aerobiose estão os seguintes: *ssrB* (regulador da expressão dos genes codificados no SPI-2) e o *ssrA* (sensora quinase do TCS SsrAB), *ttrS* e *ttrR* (quinase sensora e reguladora de resposta do TCS TtrSR, respectivamente), o gene *torR* (reguladora de resposta do TCS TorSR) e o operon *torCAD*, cuja expressão é regulada pelo TCS torSR.

A comparação da expressão de todos os genes listados (resultados de RNAseq do presente trabalho) com as respectivas expressões frente aos diferentes estímulos a que *Salmonella* foi submetida nos três trabalhos citados acima, mostrou que: todos os genes cujas expressões foram afetados na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose, tinha um perfil de expressão semelhante à expressão na presença do EF em aerobiose, resultados do estudos de Antunes *et al.*, (2014), e isso faz todo o sentido em ser semelhante, pois o ácido 3,4-DMB é um metabólito que está presente no EF. Interessantemente todos os genes listados tiveram suas expressões reprimidas nessas condições. Já a comparação do perfil de expressão dos genes afetados no nosso estudo com os estímulos a que *Salmonella* foi submetido nos estudos Kröger *et al.* (2013) e Canals *et al.* (2019) mostraram que: enquanto o perfil de expressão dos genes na presença dos diversos estímulos a que *Salmonella* foi submetida nos estudos desenvolvidos por Kröger *et al.* (2013) e Canals *et al.* (2019) tinham um perfil muito semelhantes, esses perfis de expressão foram significativamente dos nossos resultados.

Podemos destacar que alguns genes do SPI-1 que tiveram suas expressões afetadas (reprimidas) na presença do ácido 3,4-DMB, não apareceram na lista de genes afetados na presença de qualquer condição que foi testada nos estudos acima referidos. São os casos dos genes *sopE2*, *sigE*, *sopE*, *slrP*. Isso é interessante, visto que tanto os genes de SPI-1 como os genes do SPI-2 têm perfil de expressão totalmente diferente das condições ambientais que a bactéria encontra no seu percurso infeccioso e há genes importantes que foram significativamente afetados somente na presença do ácido 3,4-DMB.

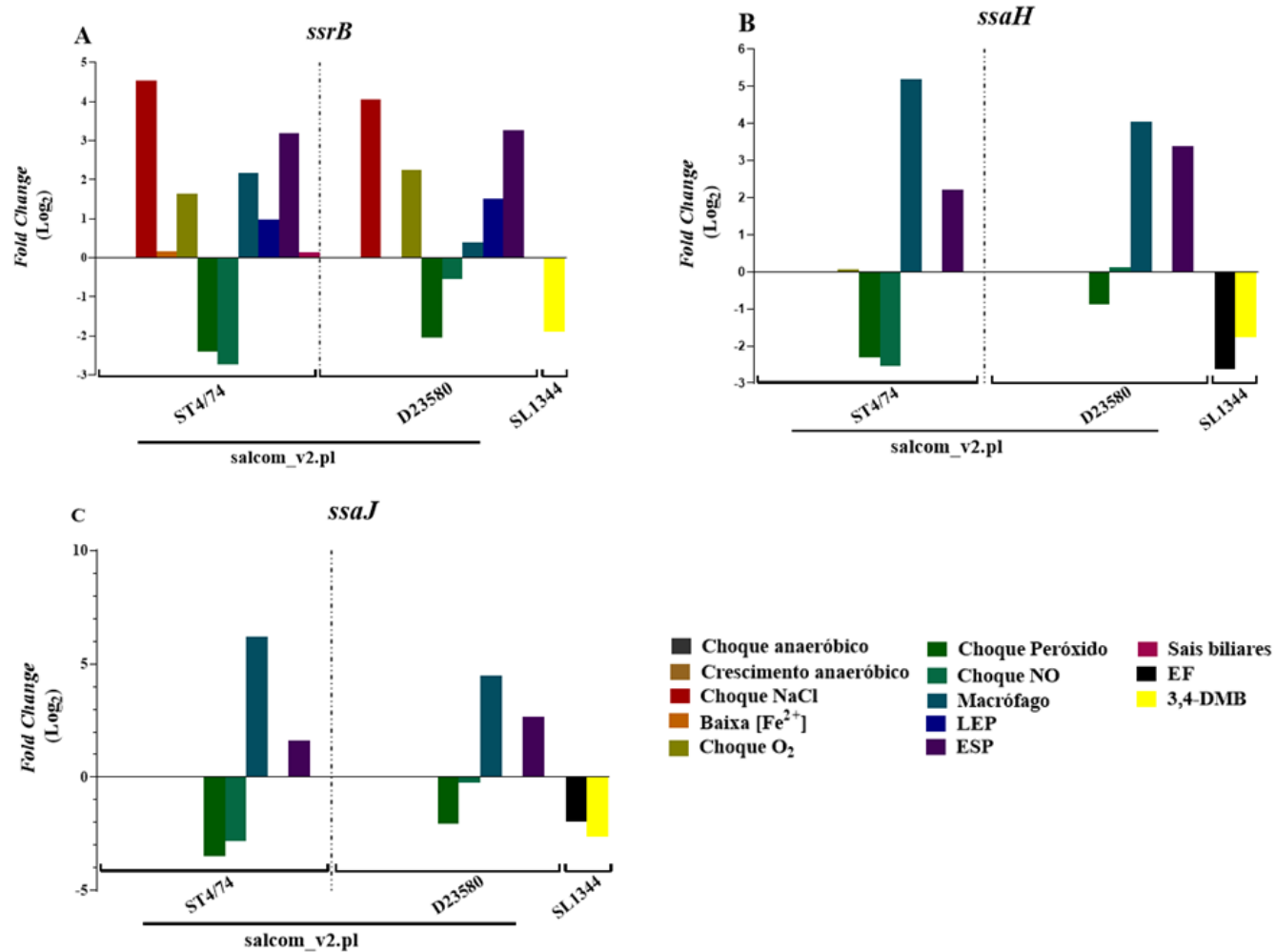
A comparação da expressão dos genes SPI-2, *ssrB*, *ssrA*, *ttrS*, *ttrR* estão representadas nos gráficos da Figura 44, já a dos genes SPI-1 e *hilA*, estão representadas nos gráficos da Figura 45.

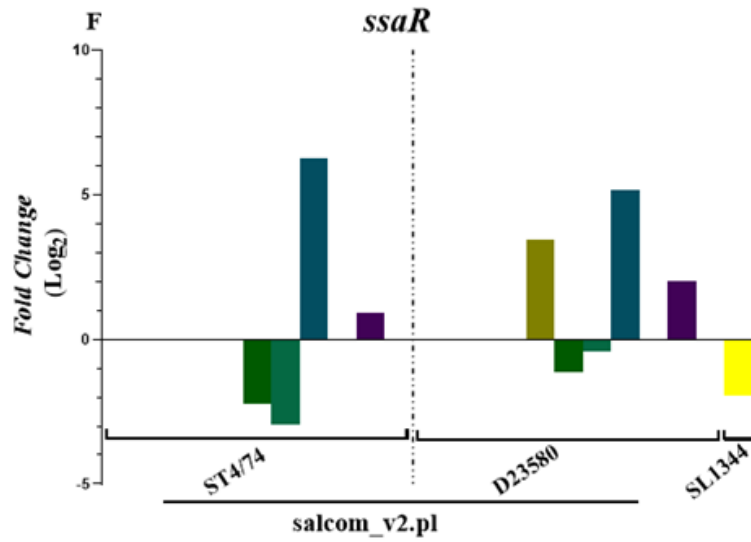
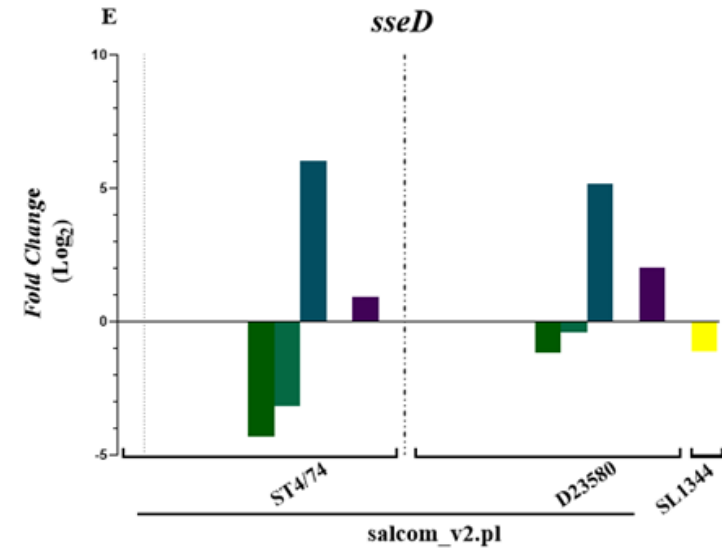
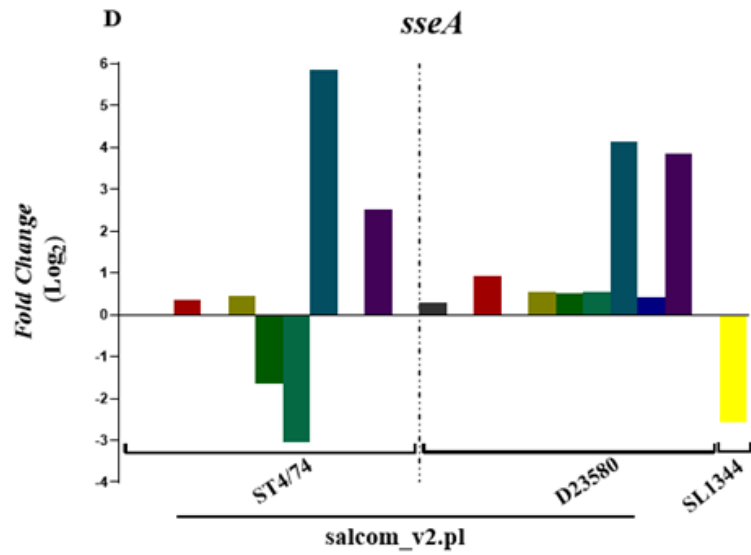
Figura 43 - Mapa genômico dos genes de virulência nas duas ilhas de patogenicidade de maior importância para a capacidade de invasão (SPI-1) e sobrevivência (SPI-2) de *Salmonella*.

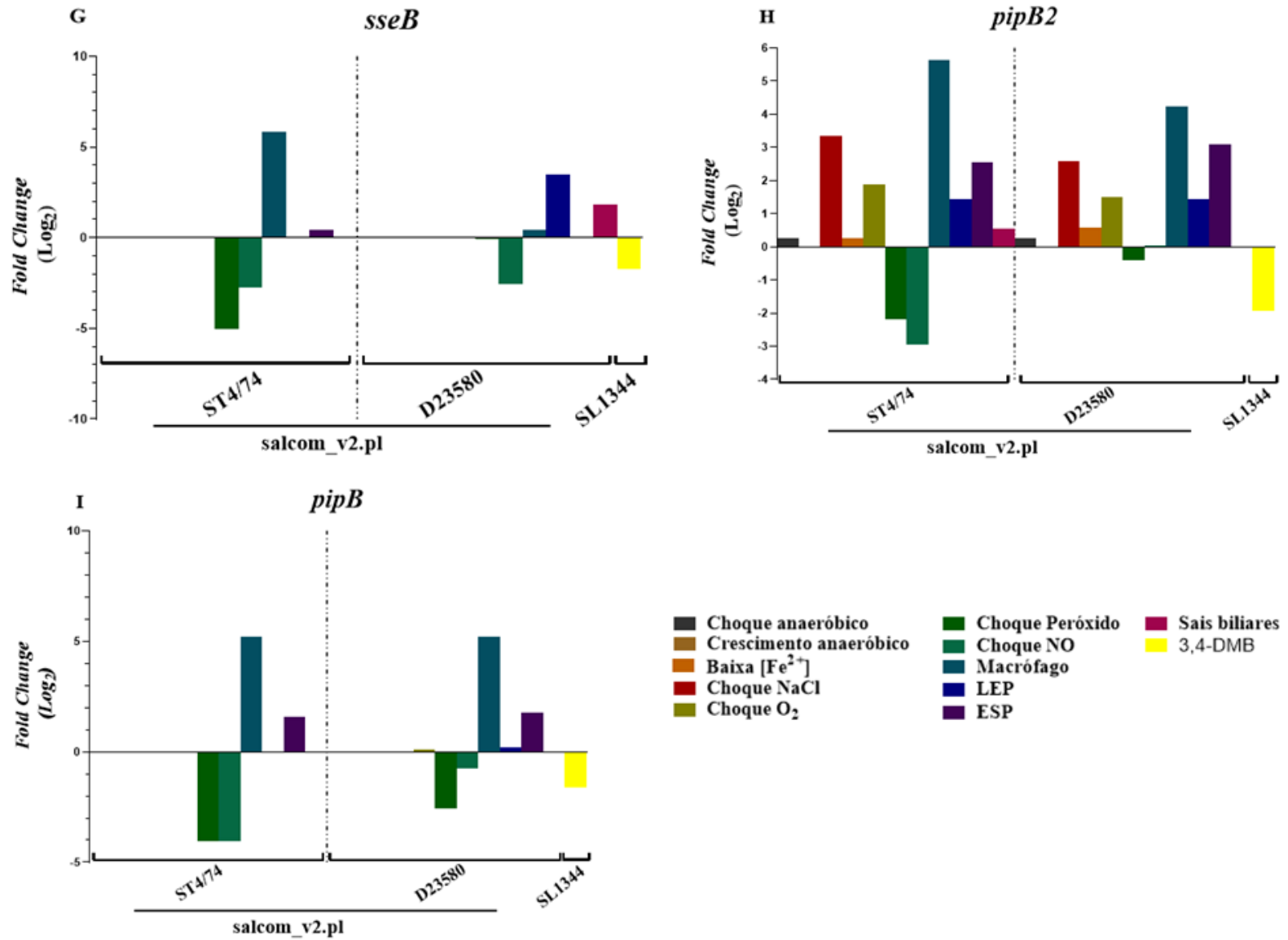


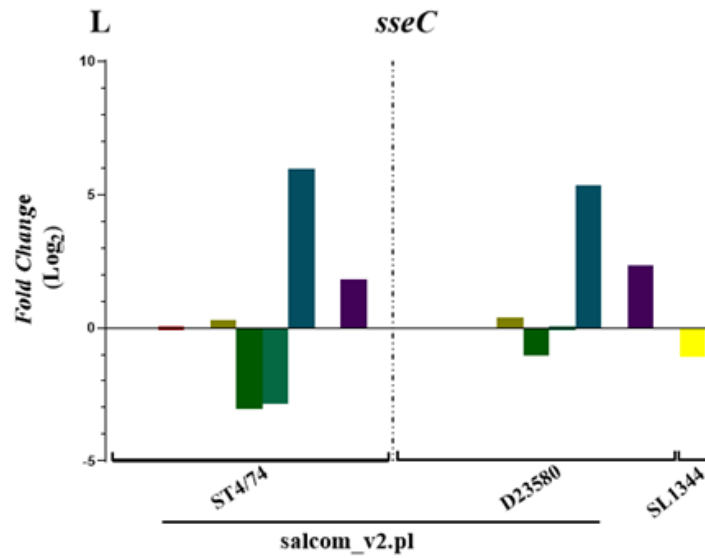
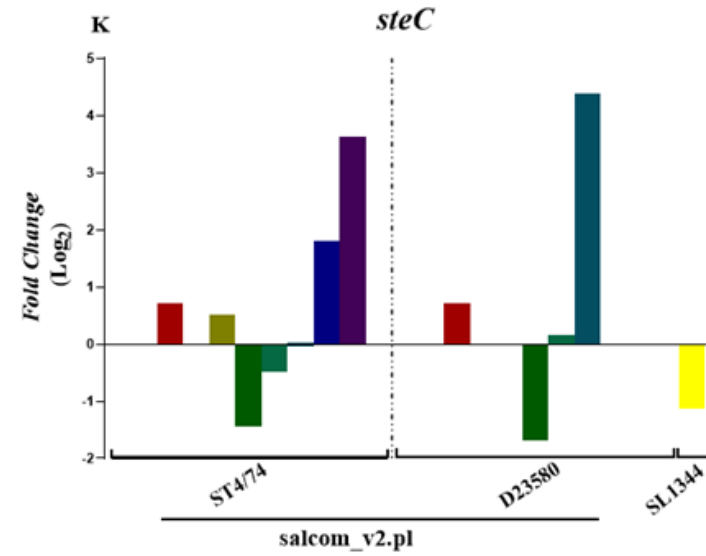
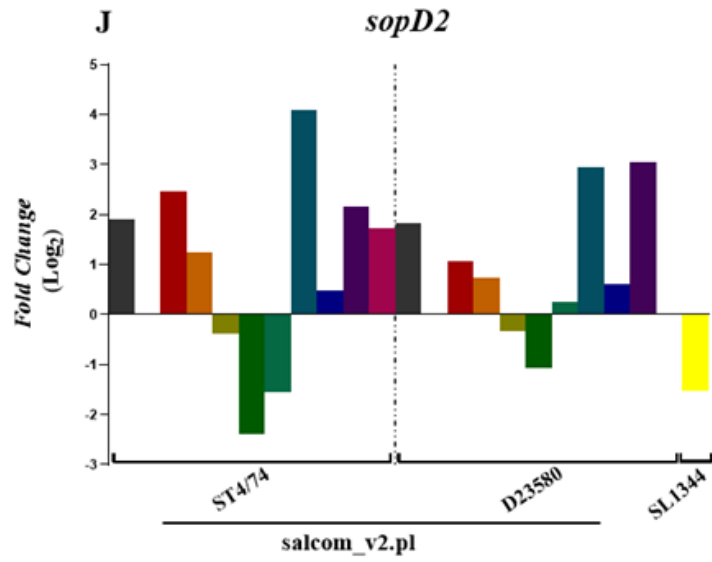
Legenda: SPI-1 é uma região genômica de aproximadamente 40 kb que inclui 39 genes que codificam proteínas envolvidas na mobilidade, síntese do T3SS-1, proteínas efetoras e proteínas chaperonas responsáveis pela invasão de células epiteliais do hospedeiro (Gerlach; Hensel, 2007; Lou Lixin *et al.*, 2019). SPI-2 é um *locus* de 40 kb constituído por genes que codificam proteínas envolvidas na montagem do T3SS-2, síntese de proteínas efetoras e chaperonas que permitem que *Salmonella* sobreviva intracelularmente em células epiteliais e células fagocíticas em compartimentos SCV (Lou, *et al.*, 2019). Fonte: Adaptado de (Fàbrega; Vila 2013).

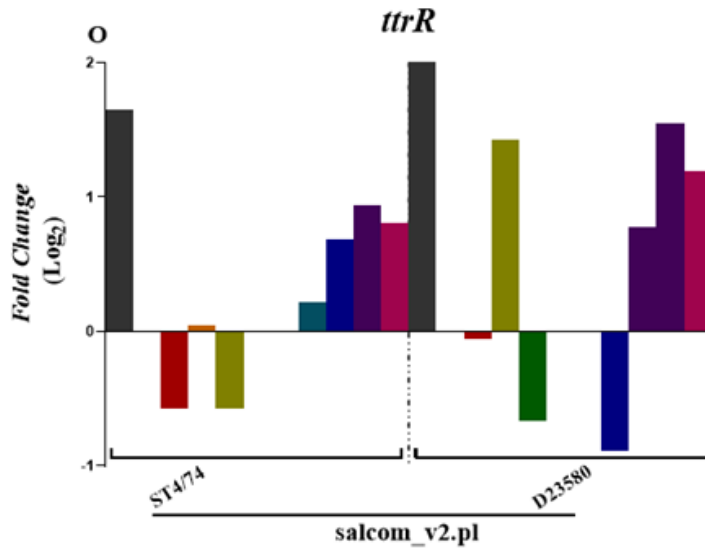
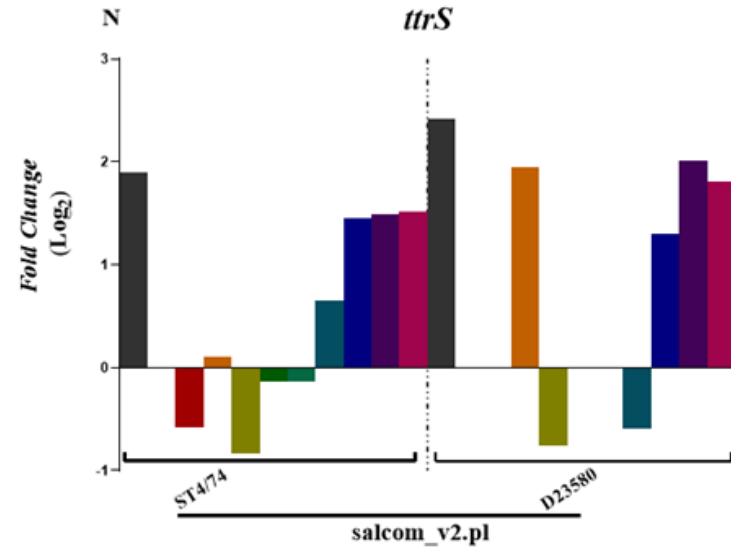
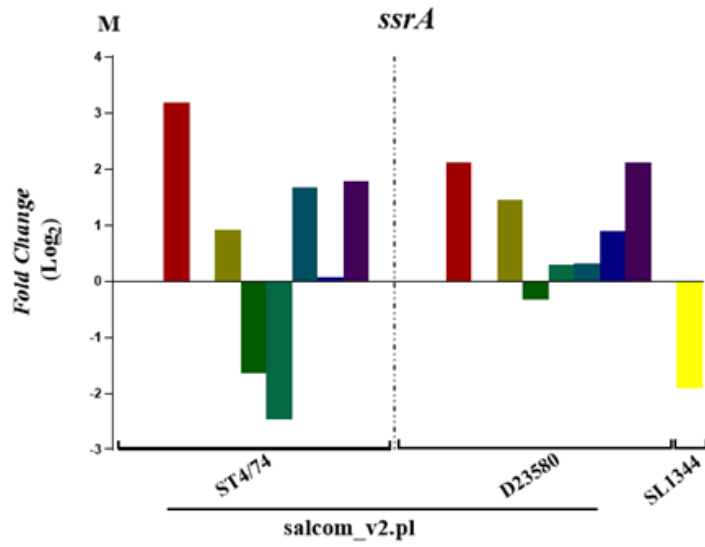
Figura 44 – Análise comparativa da expressão de genes da SPI-2 de cepas de *Salmonella* (ST4/74, D23580 e SL1344) em condições que mimetizam o processo infeccioso e na presença de EF e do ácido 3,4-DMB em aerobiose.





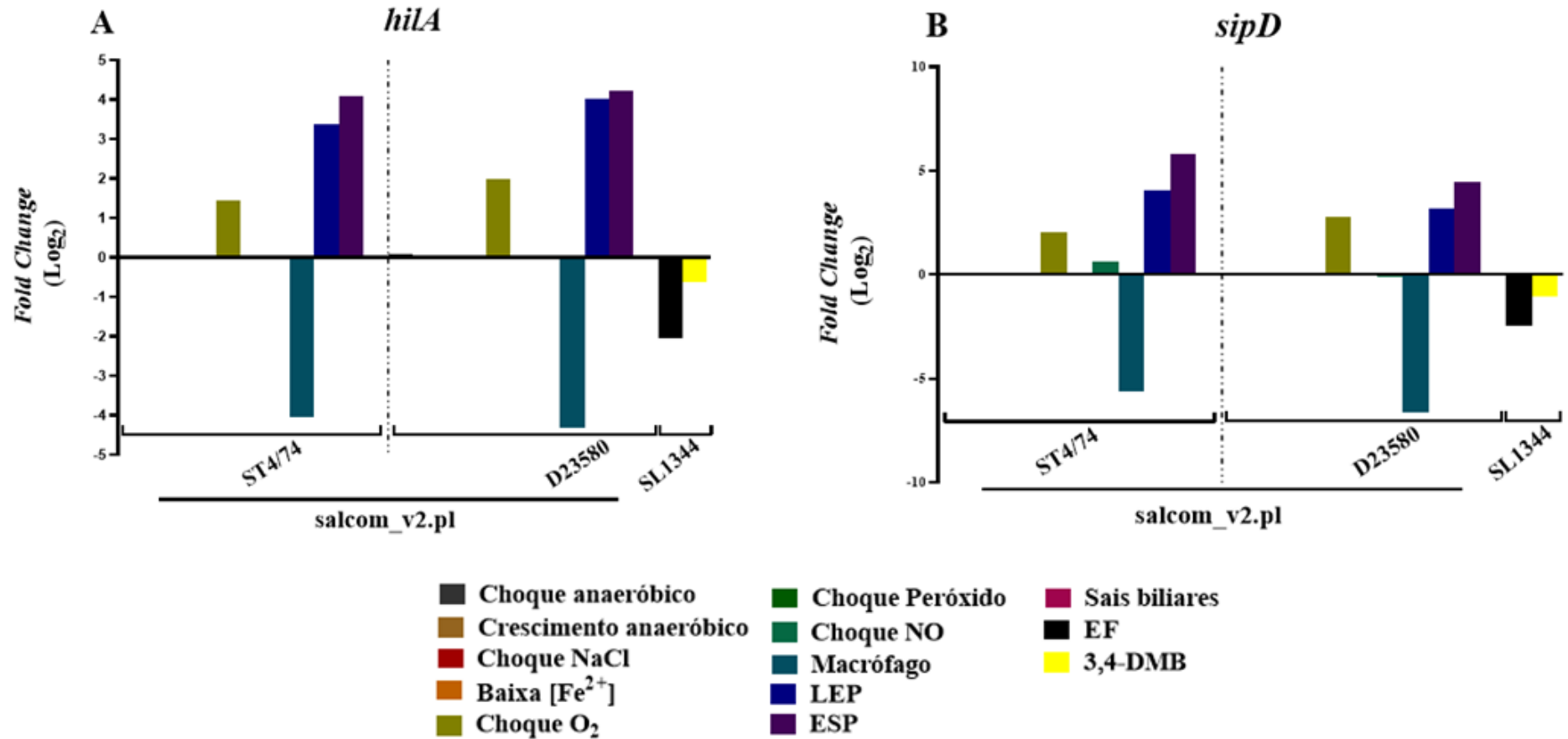


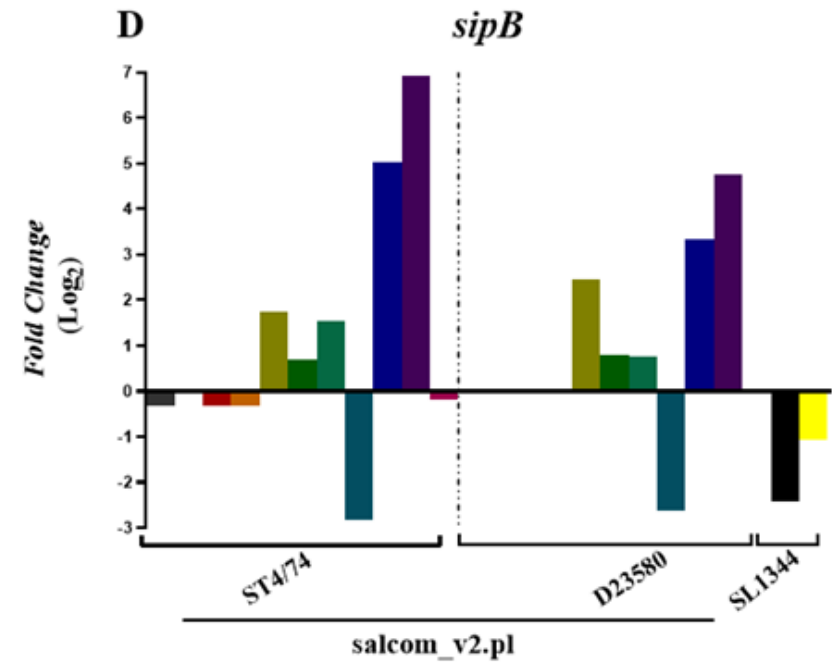
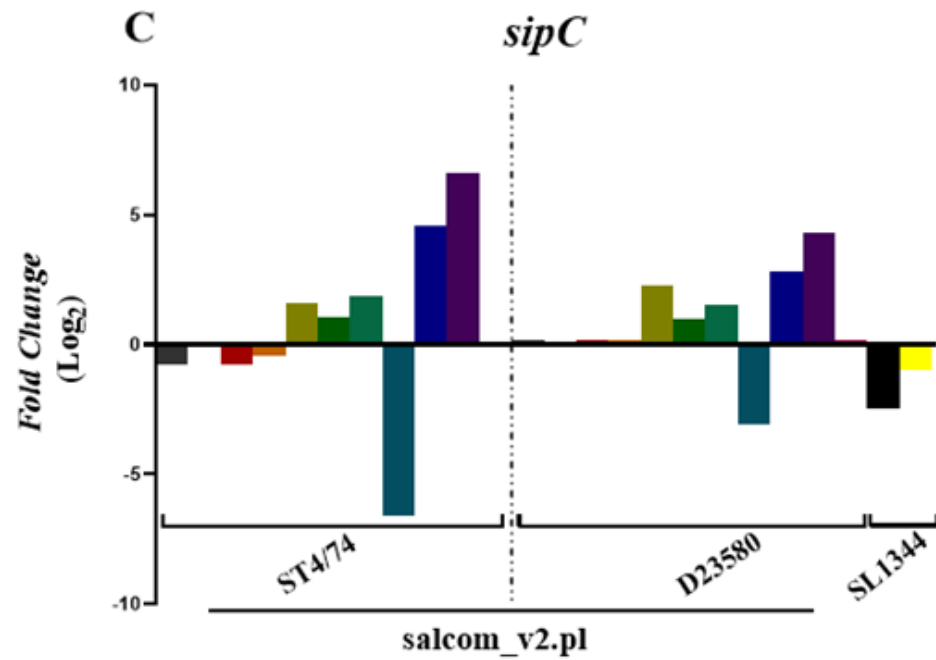




Legenda: Análise comparativa feita usando os dados de RNAseq de *Salmonella* SL1344 cultivada na presença de ácido 3,4-DMB (nosso estudo) com resultados de RNAseq de três artigos publicados na última década: (i) trabalho publicado por Kröger *et al.* (2013), em que submeteram *Salmonella* ST4/74 a 22 condições ambientais de estresse que mimetizam as condições pelas quais a bactéria passa durante o processo infeccioso (condições usadas encontram-se no anexo 1); (ii) trabalho publicado por Antunes *et al.*, (2014), em que cultivaram *Salmonella* SL1344 em aerobiose e na presença de metabólitos intestinais, presentes em extrato fecal; e (iii) trabalho publicado por Canals *et al.*, (2019), em que compararam a expressão gênica de duas cepas de *Salmonella* (ST4/74 e D23580) na presença de 16 condições de estresse pelas quais o patógeno passa ao longo do processo infeccioso (condições usadas nesse estudo encontram-se no anexo 2). Sendo assim escolhemos o perfil de expressão das seguintes condições para comparar com os nossos resultados: a) LEP – Fase de crescimento exponencial tardio; b) ESP – Fase estacionária inicial; c) choque por anaerobiose; d) crescimento em anaerobiose; e) choque por NaCl; f) choque por O₂; g) choque por peróxido (H₂O₂); h) choque por óxido nítrico (NO); i) choque por sais biliares; j) choque por ácido leve (pH 5,8) e k) choque por ácido forte (pH 3). Os genes de SPI-2 afetados (reprimidos) na presença do ácido 3,4-DMB e usados nesta comparação foram os seguintes: (A) *ssrB* (principal regulador da expressão dos genes do SPI-2), (B) *ssaH*, (C) *ssaJ*, (D) *sseA*, (E) *sseD*, (F) *ssaR*, (G) *sseB*, (H) *sseC*, (I) *pipB2*, (J) *pipB*, (K) *sopD2*, (L) *steC*, e os genes dos TCS (M) *ssrA*, (N) *ttrS* e (O) *ttrR*. Cada condição ambiental é representada por uma cor nos gráficos. Como pode ser visto, o perfil de expressão de *ssrB*, tanto na presença de EF (barra de cor preta, Antunes *et al.*, (2014) e na presença do ácido 3,4-DMB, barra amarela (nossos dados), assim como dos genes SPI-2 por ele regulados tem um perfil distinto de qualquer uma das condições testadas nos outros estudos.

Figura 45 - Análise comparativa da expressão de genes SPI-1 de cepas de *Salmonella* (ST4/74, D23580 e SL1344) em condições que mimetizam o processo infeccioso e na presença de EF e do ácido 3,4-DMB em aaerobiose.





Legenda: Análise comparativa dos dados de RNAseq de *Salmonella* SL1344 cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose com resultados dos trabalhos de Kröger *et al.*, (2013), Antunes *et al.*, (2014) e Canals *et al.*, (2019), cujas descrições já foram feitas na figura anterior. Aqui selecionamos os genes de SPI-1 cujas expressões foram afetadas de alguma forma e comparamos o perfil de expressão de cada gene com os perfis de expressão nas cepas testadas (ST4/74, SL1344 e D23580 nos três estudos anteriores) nas diversas condições de estresse ambiental, descritas na figura anterior, a que as culturas foram submetidas. Dos nossos resultados de RNAseq, encontramos o gene *hilA* reprimido assim como alguns genes do SPI-1, regulados pelo *hilA*, sendo reprimidos na presença do ácido 3,4-DMB: *sopD*, *sopE2*, *sopB*, *sigE*, *sopE*, *sipB*, *slrP* *sipD* e *sipC*. Desses genes, apenas três, *sipD* (B), *sipC* (C) e *sipB* (D) tem suas expressões afetadas em condições de estresse ambiental dos estudos anteriores. Como pode ser visto, o perfil de expressão dos genes de SPI-1 na presença de ácido 3,4-DMB, repetia o mesmo fenótipo da expressão na presença de EF (Antunes *et al.*, 2014), mas não se verificou o mesmo padrão em comparação com as condições testadas nos estudos, Kröger *et al.*, (2013) e Canals *et al.*, (2019).

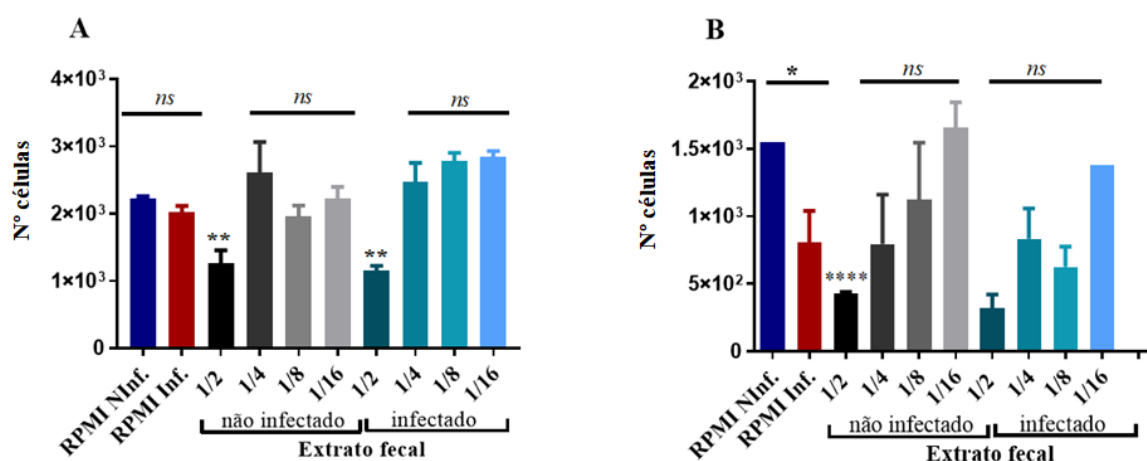
5.8. Viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*.

5.8.1. Viabilidade de RAW 264.7 na presença de EF.

Tendo em vista que não tínhamos informações sobre possíveis efeitos citotóxicos dos diferentes extratos e metabólitos usados em nossos estudos, resolvemos testar o efeito de cada um destes estímulos em células RAW 264.7. Podemos destacar o caso de EF, onde testamos diferentes concentrações de extrato a fim de se encontrar a melhor concentração que não afetasse a viabilidade dos macrófagos e ainda assim continuasse a estimular o fenótipo originalmente observado, ou seja, repressão de genes de SPI-1 e SPI-2. Foram testadas as seguintes diluições de EF em RPMI: 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16, volume de EF por volume de meio RPMI (v/v). No sentido de saber, se mesmo que a presença do EF, sozinho em RPMI não matasse os macrófagos, se uma combinação de EF e *Salmonella*, poderia diminuir a viabilidades dos macrófagos em níveis maiores dos que os observados na presença apenas de *Salmonella*. Para isso, foram realizados ensaios em que os macrófagos foram infectados com *Salmonella* na presença das diferentes diluições de EF acima descritas. No controle, foi usado apenas RPMI, na ausência ou presença de *Salmonella*. Após quatro horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂ e nas condições acima descritas foi adicionando 20 µL de solução MTT e em seguida a placa foi incubada por três horas até a leitura da densidade óptica da mesma. Testamos a viabilidade de RAW 264.7 na presença do EF nos tempos de quatro e 24 horas após a infecção. Os resultados são mostrados nos gráficos A (quatro horas) e B (24 horas) da figura 46.

Após quatro horas de cultura em RPMI contendo diversas diluições de EF, vimos que apenas na diluição 1/2 (EF/RPMI) é que o EF afetou significativamente a viabilidade celular, tanto nos poços infectados como nos poços não infectados por *Salmonella*. Comparamos também RAW 246.7 cultivadas apenas em RPMI (sem EF), onde numa triplicata infectamos as células (barra azul escuro) e nas outras triplicatas não as infectamos (barra vermelha), e verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa, o que nos levou a concluir que a perda da viabilidade de RAW 264.7 cultivada na presença de EF (diluição 1/2) é causada pela alta concentração do EF no meio e não por causa da infecção. Como as outras diluições (1/4, 1/8 e 1/16) não afetaram a viabilidade de RAW 264.7 escolhemos a diluição 1/4 para usar nos experimentos de sobrevivência de *Salmonella* na presença do EF.

Figura 46 – Viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na presença de EF.



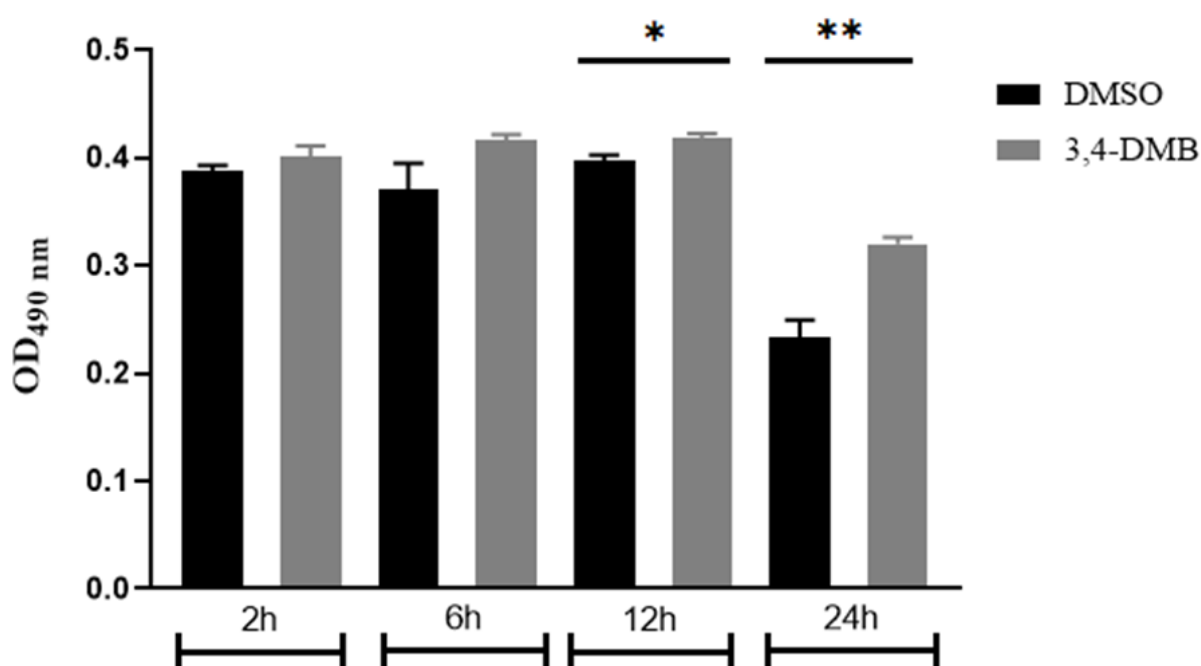
Legenda: O gráfico A representa a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 após 4 horas de cultura na presença de diferentes concentrações de EF suspenso em RPMI (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) sendo não infectados (barras cinza) ou infectados com *Salmonella* (barras azuis claras). As barras azul-escuras e vermelho escuro representam os controles da viabilidade de RAW 264.7 apenas na presença de RPMI, não infectadas (NInf, barra azul) ou infectadas (INF, barra vermelha). Cada barra representa a média de três réplicas biológicas nas respectivas condições e concentrações de EF. As barras de erro representam o desvio padrão das respectivas médias. O ensaio foi feito em placas de 96 poços, com 200 µL de cultura de cada condição. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

5.8.2. Viabilidade de RAW 264.7 na presença de ácido 3,4-DMB.

Para garantir que o efeito que pudesse vir a resultar da interação entre *Salmonella* e macrófagos RAW 264.7 na presença do ácido 3,4-DMB não fosse causado por um possível efeito citotóxico do ácido 3,4-DMB resolvemos avaliar qual é o efeito dessa molécula na viabilidade desses macrófagos. Para isso, culturas de RAW 264.7 crescidas previamente foram

sub-cultivadas na presença do ácido 3,4-DMB ou DMSO (controle). Após duas, seis, 12 e 24 horas, as respectivas densidades ópticas foram medidas e os resultados estão representados no gráfico da Figura 47. O ácido 3,4-DMB mostrou ter um pequeno efeito protetor, favorecendo a viabilidade dos RAW 264.7 de modo dependente do tempo de exposição. Porém, a magnitude das diferenças de viabilidade foi limitada. De todo modo, estes experimentos demonstraram que o ácido 3,4-DMB não exerce atividade citotóxica frente a RAW 264.7 nas concentrações testadas.

Figura 47 – Viabilidade de RAW 264.7 na presença de ácido 3,4-DMB.



Legenda: O gráfico representa a viabilidade de RAW 264.7 na presença de ácido 3,4-DMB (100 μ M) ou DMSO (volume igual ao volume usado para o ácido 3,4-DMB). Os ensaios foram feitos nos intervalos de tempo de 2, 6, 12 e 24 horas após o estímulo. Foram feitas quatro réplicas por cada condição (ácido 3,4-DMB ou DMSO 12 horas ($p=0,0486$) e 24 horas ($p= 0,0074$)). Os gráficos representam a média de réplicas biológicas e as barras de erro representam o erro padrão da média.

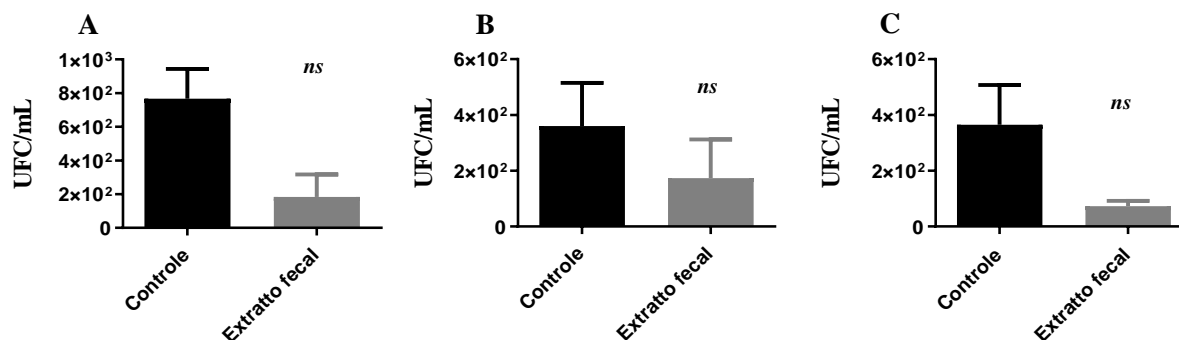
5.9. Sobrevivência de *Salmonella* cultivada na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*, no ambiente intracelular de macrófagos RAW 264.7.

Em estudos anteriores do nosso grupo foi demonstrado que tanto o EF (Antunes *et al.*, 2014) como o ácido 3,4-DMB (Peixoto *et al.*, 2017) inibem a capacidade de *Salmonella* de invadir células epiteliais. Uma das explicações plausíveis para esses resultados tem por base o

fato de grande número de genes da SPI-1, que codificam proteínas envolvidas na modulação e invasão das células epiteliais, bem como o principal regulador da expressão dos genes da SPI-1 (*hilA*), terem sido significativamente reprimidos nessas duas condições. Entretanto, como já descrito em seções anteriores desse trabalho, os dois principais fatores que caracterizam a virulência e patogenicidade de *Salmonella* são a invasão de células epiteliais intestinais e a sobrevivência no interior de células fagocíticas. Como não havia sido realizado estudo que avaliasse o impacto do EF, do ácido 3,4-DMB e do ECP de *C. citroniae* na sobrevivência intracelular de *Salmonella* em macrófagos investigamos como a presença desses compostos afetam a capacidade de *Salmonella* de sobreviver dentro destas células.

Nossos resultados mostraram que a presença de EF (suspendido em caldo LB, 1/4) afeta a sobrevivência intracelular de *Salmonella* em macrófagos. Macrófagos foram infectados com *Salmonella* crescida previamente por quatro horas na presença de EF, como já descrito na sessão 4.7 desse trabalho. Avaliamos a capacidade de sobrevivência de *Salmonella* em quatro pontos de tempo diferentes após a infecção de RAW 264.7: quatro, seis, 12 e 24 horas, como mostram os gráficos da Figura 48. Para isso, após cada tempo de interação, os macrófagos infectados com *Salmonella* foram lisados, química (solução de triton 1% e SDS 0,1%) e mecanicamente, e diluições seriadas do lisado foram plaqueadas em ágar LB contendo estreptomicina (100 µg/mL). Após 24 h de incubação a 37 °C, UFCs foram contadas e os resultados são mostrados nos gráficos da Figura 48. Nossos resultados mostraram que embora haja uma inibição da capacidade de sobrevivência de *Salmonella* cultivada na presença de EF no interior de macrófagos, essa inibição não foi estatisticamente significativa comparada ao controle, em que *Salmonella* foi cultivada na presença do solvente orgânico usado na extração dos metabólitos do EF (acetato de etila) suspendido em RPMI. No ponto de 24 horas a contagem das UFCs foram muito baixas (20 colônias) para ambas as situações, controle e EF, e por isso optáramos por não apresentar aqui esses resultados em forma de gráficos. Porém, o perfil da inibição da capacidade de sobrevivência de *Salmonella* cultivada na presença do EF foi semelhante nos diferentes pontos do tempo de interação.

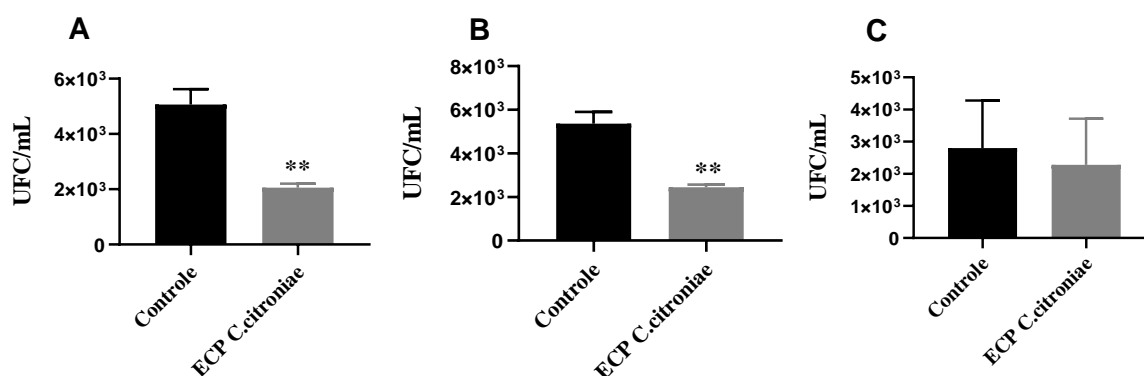
Figura 48 – Sobrevivência de *Salmonella* cultivada na presença de EF em macrófagos RAW 264.7.



Legenda: As barras pretas representam o controle (*Salmonella* na presença de evaporado de acetato de etila). As barras cinzas representam o EF. As letras A, B e C representam os resultados de sobrevivência nos intervalos de tempo: A) quatro horas, B) seis horas e C) 12 horas após a interação com RAW 264.7 em meio RMPI contendo EF. A) $p=0,0577$; B) $p=0,04293$ e C) $p=0,0882$. Os resultados representam a média de quatro ($n=4$) réplicas biológicas de cada condição e as barras de erro representam o desvio padrão das respectivas médias.

Os resultados de interação entre *Salmonella* cultivada na presença de ECP de *C. citroniae* foram interessantes, tendo em vista que houve uma inibição significativa da capacidade de sobrevivência por parte de *Salmonella* no interior de RAW 264.7 na presença deste extrato. Vale lembrar que *Salmonella* é sub-cultivada na presença de ECP de *C. citroniae* suspenso em meio LB (1/2, v/v) contendo estreptomicina 100 ($\mu\text{g/mL}$) a partir de uma cultura de *Salmonella* de *overnight* em meio LB contendo estreptomicina 100 ($\mu\text{g/mL}$). O estímulo do ECP de *C. citroniae* foi mantido durante os respectivos tempos de interação. Após 24 de interação, o efeito do ECP de *C. citroniae* na sobrevivência intracelular de *Salmonella* em RAW 264.7 deixou de ser estatisticamente significativo, como tinha sido verificada nos pontos anteriores testados como mostra a figura 49.

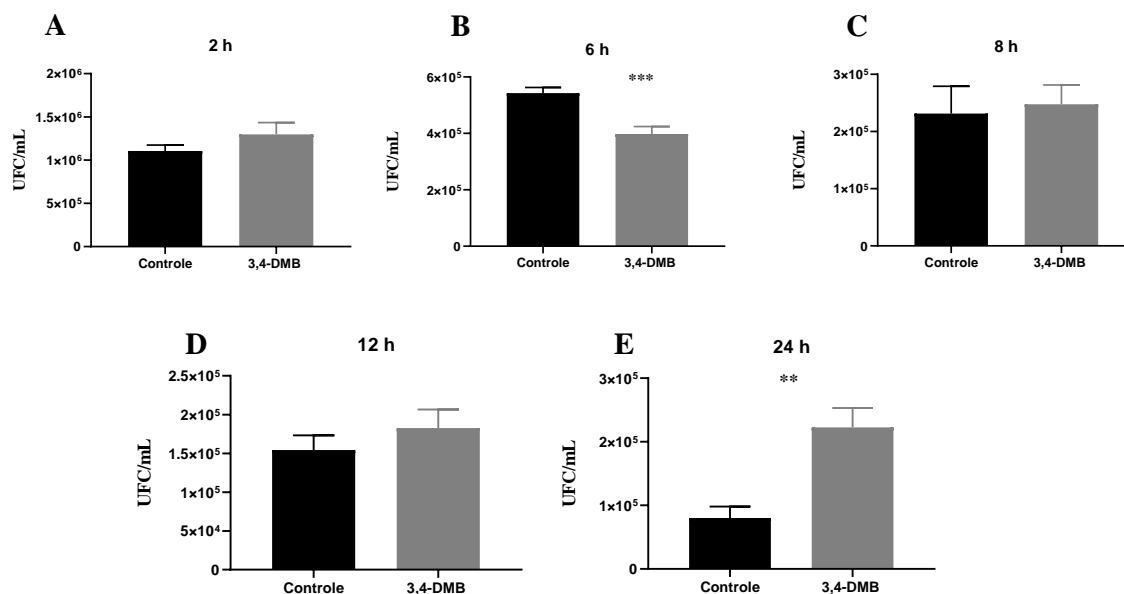
Figura 49 - Sobrevivência de *Salmonella* em macrófagos RAW 264.7 na presença de ECP de *C. citroniae*.



Legenda: Barras pretas representam o controle (*Salmonella* cultivada na presença de extrato de meio BHI), enquanto barras cinza representam efeitos do ECP de *C. citroniae* na sobrevivência intracelular de *Salmonella*. As letras A, B e C representam os resultados de sobrevivência nos intervalos de tempo: A) quatro horas, B) seis horas e C) 24 horas após a interação com RAW 264.7 em meio RMPI contendo ECP de *C. citroniae*. A) $p=0,0021$; B) $p=0,0061$ e C) NS, $p=0,8076$. As barras mostram as médias de quatro ($n=4$) réplicas biológicas de cada condição. A barra de erro representa o desvio padrão das respectivas médias.

O efeito repressor da invasão de *Salmonella* em células epiteliais por parte do ácido 3,4-DMB já era conhecido de estudo anterior do nosso grupo (Peixoto *et al.*, 2017); porém, não se sabia qual o efeito do ácido 3,4-DMB na sobrevivência de *Salmonella* no interior dos macrófagos. Propusemo-nos a testar esse efeito e para isso cultivamos *Salmonella* na presença do ácido 3,4-DMB (100 μ M) em LB por quatro horas e em seguida infectamos células RAW 264.7. O estímulo do ácido 3,4-DMB foi mantido durante todo o tempo de interação. Pelo nosso resultado, parece que o ácido 3,4-DMB tem um efeito que favorece ligeiramente a capacidade de sobrevivência de *Salmonella* no interior de RAW 264.7, embora no ponto de seis horas o ácido teve um efeito repressor na sobrevivência de *Salmonella*. Já no ponto de 24 horas o ácido 3,4-DMB parece potencializar significativamente essa capacidade de *Salmonella* de sobreviver no interior de RAW 264.7, como mostram os gráficos da figura 50.

Figura 50 – Sobrevivência intracelular de *Salmonella* na presença do ácido 3,4-DMB.



Legenda:

Barras pretas representam a sobrevivência de *Salmonella* na presença de DMSO (controle) diluído em RPMI contendo gentamicina (100 µg/mL), enquanto barras cinza representam a sobrevivência de *Salmonella* na presença do ácido 3,4-DMB (100 µM) suspenso em RPMI contendo gentamicina (100 µg/mL). As letras A, B, C, D e E, representam os gráficos para os tempos de duas, seis, oito, 12 e 24 horas, respectivamente, após o início da interação entre *Salmonella* e RAW 264.7. *Salmonella* foi previamente crescida por quatro horas na presença de ácido 3,4-DMB, e o estímulo foi mantido na cultura durante os tempos de interação. teste t não pareado foi realizado entre o controle e o 3,4-DMB em cada ponto (duas, seis, oito, 12 e 24 horas) e os valores do p foram os seguintes: 0,2271, 0,0007, 0,7838, 0,3827 e 0,0013, respectivamente. Os resultados representam a média de quatro réplicas biológicas para cada condição. A barra de erros representa o desvio padrão das respectivas médias.

6. DISCUSSÃO

Se pensarmos na microbiota intestinal como uma floresta tropical, densamente habitada por milhares de diferentes espécies de plantas, mamíferos, répteis, anfíbios, insetos, fungos e bactérias que interagem constantemente, é bem visível a complexidade resultante da grande diversidade de espécies e das suas inúmeras interações estabelecidas nesse ecossistema. Querendo ou não, as vivências de uma espécie, incluindo seus hábitos alimentares, comportamentais, reprodutivos e da luta pela sobrevivência acabam influenciando a rotina do “dia-a-dia” de outros indivíduos desse ecossistema. Cada espécie tem um espaço nessa floresta onde se sente mais adaptada, e não mede esforços para salvaguardar a sua segurança e a do seu território. Intrusos são expulsos e, para esse fim, várias estratégias de ataque e defesa são usadas durante esses combates vorazes. Por outro lado, todas as espécies que habitam essa floresta são influenciadas por fatores ambientais, tais como o clima, a disponibilidade de alimentos, água e espaço, variações de temperatura, entre outros. Do mesmo modo, as ações dessas espécies têm um forte impacto sobre esse ambiente, mas a convivência é saudável e o equilíbrio entre os seres vivos desse ecossistema e o ambiente é estável. A essa interação entre todas as espécies desse ecossistema e todos os fatores ambientais presentes é chamada de eubiose.

Seguindo essa mesma lógica de raciocínio pode-se fazer uma analogia interessante com o complexo ecossistema da microbiota intestinal. O desenvolvimento de novas tecnologias, equipamentos e métodos de investigação, como o sequenciamento de última geração, permitiu-nos a obtenção de resultados robustos, mostrando a diversidade de microrganismos que coabitam no nosso corpo, em particular no nosso trato gastrointestinal. Hoje temos um conhecimento cada vez melhor da diversidade, das interações, das estratégias de adaptação e de sobrevivência nesse ambiente complexo e desafiador (Fraher; Toole; Quigley, 2012; Marchesi *et al.*, 2016). Esses estudos têm vindo a esclarecer cada vez mais as complexas interações estabelecidas entre os membros da microbiota e entre a microbiota e o hospedeiro, tanto no nível do epitélio adjacente, bem como com as células do sistema imunológico. Essa interação é sincronizada de tal modo que num indivíduo saudável é mantido um equilíbrio que permite a cada microrganismo colonizar seu nicho específico compartilhando ou lutando com outros integrantes desse complexo ecossistema. O comportamento, nutrição e metabolismo de uma espécie influencia, direta ou indiretamente, a dinâmica e sobrevivência dos outros membros da microbiota, e influenciam processos fisiológicos e homeostáticos do hospedeiro.

A quebra desse equilíbrio é o fator primordial para desencadear um processo de disbiose, que se caracteriza pelo desequilíbrio generalizado da microbiota permitindo que patógenos externos (ex: *Salmonella*), adquiridos pela ingestão de água e alimentos contaminados, encontrem possibilidades de se estabelecer, multiplicar e causar doenças (O'Hara; Shanahan, 2006; Sekirov *et al.*, 2010; Fraher; Toole; Quigley, 2012). Por outro lado, mesmo espécies integrantes da microbiota, em situações de disbiose podem se aproveitar dessa fragilidade e se tornam um problema grave e persistente, como é o caso de infecção por *Clostridioides difficile* (Darkoh *et al.*, 2019).

Como resultado do seu processo metabólico, os membros da microbiota intestinal geram inúmeras moléculas de baixo peso molecular, chamados de metabólitos, que modulam a dinâmica e sobrevivência de outros indivíduos, já que essas moléculas podem inibir ou potencializar a expressão de genes que beneficiam ou prejudicam a adaptação e consequente sobrevivência de outras espécies (Antunes *et al.*, 2014). Em estudos anteriores do nosso grupo, foi investigado como os metabólitos intestinais humanos modulavam diversos processos da vida de bactérias patogênicas, em particular *Salmonella*. Foi verificado que processos como mobilidade e invasão foram profundamente afetados por algum metabólito ou grupo de metabólitos. Verificou-se também que esse fato era comum na maioria dos indivíduos saudáveis. Nesse mesmo estudo verificou-se que, na verdade, metabólitos intestinais humanos presentes no extrato fecal reprimiam a expressão e consequente função do gene *hila*, que codifica a proteína HilA, um membro da família de reguladores transcricionais OmpR/ToxR bem estudado pelo seu papel como regulador mestre da (SPI-1), região genômica que codifica proteínas responsáveis pela mobilidade e invasão de células epiteliais do hospedeiro (Marcus *et al.*, 2000; Gerlach; Hensel, 2007; Antunes *et al.*, 2014).

6.1. Efeito de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* na expressão de *hila*.

Resultados de estudos anteriores do nosso grupo já haviam mostrado que metabólitos intestinais reprimem significativamente a expressão de *hila*. Esse efeito repressor foi verificado em *Salmonella* cultivada tanto na presença de EF de indivíduos saudáveis e na presença de ECP de *C. citroniae* em aerobiose (Antunes *et al.*, 2014) como também pelo ácido 3,4-DMB (Peixoto *et al.*, 2017). Porém o efeito desses extratos e do ácido 3,4-DMB este na expressão de *hila* não haviam sido testados para *Salmonella* cultivada em anaerobiose. Os resultados de avaliação de

expressão do *hila* de *Salmonella* cultivada na presença dos extratos e do ácido 3,4-DMB, tanto em aerobiose como em anaerobiose foi uma repressão, e em alguns casos de forma significativa como mostra a Figura 5. Entender de que forma os metabólitos do EF, ECP de *C. citroniae* e ácido 3,4-DMB afetam a expressão de *hila* nos dá uma ideia de como genes importantes para a virulência de *Salmonella* poderão ser afetados. HilA ativa genes que codificam todos os componentes necessários para um T3SS-1 funcional. Dados de vários estudos sugerem que o nível de expressão dos genes de SPI-1 e T3SS-1 dependem diretamente do regulador HilA (Bajaj; Hwang; Lee, 1995 Bajaj *et al.*, 1996). Ensaio de competição com ratos BALB/c mostraram que uma deleção de *hila* é fenotipicamente equivalente a uma deleção de todo o locus SPI-1 (Bajaj *et al.*, 1996; Lucas *et al.*, 2000; Lostroh; Lee, 2001). Embora nos nossos resultados de RNAseq, o gene *hila* não consta da lista de genes que foram afetadas (reprimidas ou ativadas) em nível 2 ou mais em *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose em comparação ao controle, *Salmonella* cultivada na presença do DMSO em aerobiose, verificamos que na verdade a sua expressão foi reprimida, porém em nível baixo, 1,54 vezes, e por esse motivo não consta da lista. Esse resultado corrobora com o resultado de PCR em tempo real em que nessa mesma condição, a expressão do *hila* também foi reprimido.

Um patógeno entérico bacteriano como *Salmonella* é exposto a grande número de ambientes estressantes durante o seu ciclo infeccioso, e as formas como a bactéria percebe e responde às múltiplas situações de estresse, de diferentes naturezas químicas, são complexas e um campo de constante investigação. O estresse ocorre quando a célula bacteriana experimenta mudanças repentinas em seu ambiente externo (Rychlik; Barrow, 2005). Como forma de perceber as condições do ambiente externo que de algum modo podem influenciar a sua adaptação, sobrevivência e sucesso na colonização de um ambiente, muitas bactérias desenvolveram vários sistemas dos quais se destacam os TCS, sistemas de sinalização eficazes que lhes permitem monitorar as condições do ambiente externo e com isso modular a expressão de genes específicos no sentido de melhor se adaptar àquela condição específica (Khorchid; Ikura, 2006; Dev Alexander Mitrophanov; Groisman; Mitrophanov, 2014). Estudos investigando o efeito dos metabólitos intestinais na expressão dos genes de TCS em *Salmonella*, e de como estes afetam processos cruciais para a patogênese bacteriana, tais como invasão às células epiteliais e sobrevivência em macrófagos, são escassos.

Como já foi abordado anteriormente, um dos primeiros obstáculos que *Salmonella* precisa superar ao longo do trato gastrointestinal até se estabelecer no intestino é o pH ácido estomacal. Estudos tem mostrado que o pH ácido é um estímulo e um fator importante na forma

como a bactéria modula sua expressão gênica. Foi mostrado que em pH ácido, 47% de todos os genes de *Salmonella* são reprimidos ou ativados, e muitos destes genes são fundamentais para processos vitais da bactéria (Ryan *et al.*, 2015).

No nosso estudo, podemos constatar que muitos dos 27 TCS já foram bem estudados e suas funções bem caracterizadas, sendo que alguns desses TCS foram totalmente descritos e caracterizados em *E. coli*. TCS que estão diretamente envolvidos com processos cruciais para a bactéria foram na maior parte afetados pelos EF, 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*. O efeito na expressão desses genes sob essas condições muitas vezes apresentou um perfil totalmente oposto quando se compara as expressões de culturas feitas em aerobiose e anaerobiose. O papel de muitos desses TCS estão bem caracterizados na literatura, principalmente em *E. coli*. Esses podem influenciar uns aos outros, ativando ou reprimindo a função do outro; porém, o papel que os metabólitos intestinais têm na modulação da expressão desses genes é ainda muito pouco estudado. Muitos desses sistemas têm uma importância mais crítica para a virulência, tais como os TCS EnvZ-OmpR, SsrAB, PhoQP, TorSR, TtrSR, QseCB.

Os sistemas de dois componentes de *Salmonella* estão organizados em seis famílias: a) família OmpR; b) família NarL; c) família LuxR; d) família NtrC; e) família CitB e f) família quimiotaxia. Da família de TCS OmpR, destacam-se os TCS PhoPQ, EnvZ-OmpR, TorSR e QseCB, que desempenham papéis importantes e são sistemas chaves no processo de virulência, principalmente no processo de invasão de células epiteliais do hospedeiro (TCS PhoPQ e EnvZ OmpR) (Elhadad; Desai; Grassl, 2016), na aquisição de aceptores alternativo de elétrons (TorSR) (Moore; Hendrickson, 2012; Carey *et al.*, 2018;) e na sinalização e comunicação bacteriana por meio de moléculas do *quorum sensing* (QseCB) (Clarke *et al.*, 2006; Bearson; Bearson, 2008;)

É interessante, inicialmente, ter um olhar atento em relação à complexidade de interação entre esses TCS. Para ilustrar o quão complexo e sinérgico são esses TCS, construímos uma rede de interação com todos as quinases sensores de TCS presentes e descritos até a data em *Salmonella*, como demonstrado na Figura 7. A cepa de *Salmonella* 90371 é uma das poucas cepas disponíveis na base de dados STRING. Por esse motivo fizemos BLAST para todos os sensores quinases das duas cepas (90371 e SL1344) a fim de saber se podíamos construir a rede de interação usando a cepa disponível no STRING e extrapolar esses resultados para a cepa com a qual trabalhamos (SL1344). Como já foram mostrados por vários estudos, os TCS não são sistemas isolados e se interagem entre si em diferentes níveis de complexidade (Ruiz-Albert *et al.*, 2003; Groban *et al.*, 2009; Pullinger *et al.*, 2010; Carey *et al.*, 2018). Muitos TCS, além

de serem ativados por sinais ambientais específicos, podem ter sua ação ativada indiretamente por outros TCS e, ademais, algumas proteínas reguladoras de resposta, em algum momento e dependendo de alguns estímulos, podem funcionar como quinases sensoras, como é o caso do SsrB (Desai *et al.*, 2016; Banda *et al.*, 2019b; Tze *et al.*, 2019). O TCS SsrAB, que regula a expressão dos genes do *locus* SPI-2 e conseqüentemente regula a capacidade da bactéria de sobreviver intracelularmente em células fagocíticas, especialmente os macrófagos, é um TCS interessante na medida em que ele pode ser ativado pelo seu estímulo específico, pH levemente ácido, resultando na autofosforilação do SsrA e conseqüente fosforilação do seu regulador de resposta, o SsrB. Porém, vários estudos mostraram que SsrB pode ser ativado (fosforilado) por outras vias que não envolvem SsrA. Os TCS EnvZ-OmpR e PhoPQ, quando estimulados pelo pH ácido do meio, baixa concentração de sais ou presença de íons Mg^{2+} ativam SsrB, e isto induz a formação de biofilme em ambiente intestinal. Curiosamente, essa ativação é independente de SsrA. Estas proteínas reguladoras de resposta que em algum momento funcionam como quinases sensoras tem uma particularidade interessante que é de a ter um domínio receptor que faz com que sejam ativados por outros TCS (Lee; Detweiler; Falkow, 2000; Ruiz-Albert *et al.*, 2003; Tze *et al.*, 2019).

Como forma de melhor organizar a discussão dos resultados, os TCSs foram organizados de acordo com as funções desempenhadas. Os TCS cujas HK estão envolvidas com invasão de células epiteliais e sobrevivência em macrófagos e os TCS envolvidos com a respiração serão aqui discutidos devido à sua relevância no processo de virulência de *Salmonella* e por terem sido significativamente mais afetados, em quase todas as condições estudadas. TCS que não foram significativamente afetados não foram detalhados na discussão, para evitar a repetição de descrições presentes nos resultados.

6.2. Efeito de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* em TCS envolvidos na invasão e sobrevivência em células hospedeiras.

Embora as bactérias tenham uma capacidade limitada de manipular seu ambiente, elas têm uma capacidade notável de se adaptar às mudanças nas condições ambientais, mantendo a homeostase intracelular. Sistemas de sinalização contribuem para essa plasticidade das bactérias em se adaptarem com facilidade a ambientes estressantes, devido em grande parte aos

TCS, cujas funções abrangem respostas sensoriais e regulatórias, importante mecanismo de adaptação em procariotos. Como muitos sistemas de controle projetados por engenheiros, os sistemas de controle molecular usados pelas células devem operar em condições imprevisíveis (Schramke *et al.*, 2016).

A capacidade de invadir e sobreviver nas células hospedeiras são características codificadas por genes localizados dentro das SPI-1 e SPI-2, respectivamente. A regulação dos genes codificados nessas SPI é complexa e, dentre os reguladores que participam de forma direta ou indireta nessa regulação, destaca-se um conjunto de TCS, os TCS PhoPQ, EnvZ-OmpR, RstAB, RcsBCD e BarA-SirA na regulação dos genes SPI-1 mediante ativação ou repressão da expressão do regulador mestre das SPI-1, *hila* e, os TCS EnvZ-OmpR, PhoPQ e SsrAB na regulação do SPI-2. Nesse tópico, destacamos o papel de cada um desses TCS e qual foi o efeito dos diferentes estímulos testados na expressão das respectivas quinases sensoras. É de se realçar que os TCS não funcionam como entidades isoladas, isto é, muitos TCS influenciam ou regulam outros TCS, como tentamos demonstrar na discussão a seguir.

6.2.1. Sistema de dois componentes EnvZ-OmpR.

Nossos resultados de expressão relativa do gene *envZ* mostraram que sua expressão foi significativamente afetada tanto na presença do EF, como na presença do ácido 3,4-DMB em ambas as condições, aerobiose e anaerobiose. Entretanto, vale ressaltar que o perfil de regulação foi bem diferente. A expressão de *envZ* na presença de EF, em aerobiose e anaerobiose, foram significativamente afetadas: a expressão de *envZ* na presença de EF em aerobiose foi ativada, com uma ativação de 30 vezes em relação ao controle. Já em anaerobiose, a expressão do *envZ* foi 10 vezes maior em comparação com o controle. O ácido 3,4-DMB ativou significativamente a expressão de *envZ* em aerobiose, mas o efeito em anaerobiose foi o contrário. Por último, o extrato de cultura pura do membro da microbiota intestinal, *C. citroniae* reprimiu de forma significativa a expressão do *envZ* em aerobiose, e ativou a expressão em anaerobiose. O efeito desses extratos e do metabólito ácido 3,4-DMB é interessante haja visto que esses TCS estão envolvidos direta ou indiretamente na regulação da expressão de vários genes, inclusive na regulação de outros TCS como é o caso de SsrAB (Garmendia *et al.*, 2003; Chakraborty; Mizusaki; Kenney, 2015).

Diferente do que acontece em *E. coli*, em *Salmonella*, além de responder a mudanças de osmolaridade, o TCS EnvZ-OmpR é ativado pelo pH ácido no SCV. Muitos estudos indicam que o pH neste compartimento é de aproximadamente 5 (Bajaj *et al.*, 1996; Kimbrough; Miller, 2002) e o SCV é comparável a um fagossomo normal em termos de sua biogênese (Drecktrah *et al.*, 2007).

Estudos vêm mostrando que *envZ* responde ao estresse osmótico citoplasmático, e não ao estresse extracelular, e é capaz de detectar a osmolaridade e ativar seu regulador de resposta *ompR* sem estar na membrana. Este resultado é interessante pois mostra que *Salmonella* pode responder ao pH ácido do vacúolo de macrófagos, acidificando seu citoplasma e fornecendo os prótons que direcionam a formação da conformação ativa de EnvZ, e que promove sua autofosforilação e consequente fosforilação de OmpR (Wang *et al.*, 2012). Esse resultado levantou uma questão interessante que é se o citoplasma de *Salmonella* é acidificado quando a bactéria é internalizada no vacúolo ácido. Para investigar essa suspeita, pesquisadores transformaram *Salmonella* com *I-switch*, um biossensor à base de DNA e FRET, e usaram o *I-switch* contendo bactérias para infectar macrófagos da linhagem RAW 264.7. Por meio dessa técnica, puderam medir o pH de *Salmonella* no interior dos macrófagos (~30 minutos após a infecção). Assim, observaram que o citoplasma foi acidificado a partir de um pH inicial de 6,8 a pH 5,75 e posteriormente a pH 5,65). A acidificação foi inteiramente dependente do OmpR, tendo em vista que o citoplasma das cepas nulas de *ompR* permaneceu em pH neutro (Chakraborty; Mizusaki; Kenney, 2015). Este estímulo é de extrema importância para a adaptação, modulação do microambiente no interior do vacúolo e para ativação do T3SS-2 e todas as proteínas efetoras (Chakraborty; Mizusaki; Kenney, 2015).

Para manter o citoplasma de *Salmonella* em pH ácido nesse compartimento também com pH ácido, OmpR desempenha um outro papel crucial que é o de se ligar diretamente e reprimir o operon *cadC/BA* para inibir a neutralização do pH do citoplasma. Nesse operon, o CadC é um regulador de resposta da subfamília OmpR e, em pH ácido, induz *cadC/A*. CadA é uma descarboxilase de lisina que consome um próton durante a descarboxilação. O CadB, um anti-porter, após o processo de descarboxilação, transporta o produto residual para fora da célula, restaurando o pH intracelular para quase neutro. O pH ótimo de 6,1 a 6,5 do sistema CAD o torna o principal sistema de descarboxilação de aminoácidos quando *Salmonella* encontra-se no interior do vacúolo (Kenney, 2018). Esse papel de reprimir o operon *cadC/BA* por parte de OmpR é muito importante para a regulação de outros genes e sistemas. A manutenção do pH ácido no citoplasma da *Salmonella* é importante para manter um estímulo

contínuo no TCS SsrA/B. O estresse ácido induz a transcrição de *ssrA* e *ssrB*. SsrB fosforilado (SsrB~P) leva a ativação dos genes SPI-2. Desta forma, a repressão do operon *cadC/BA* pelo OmpR é importante para a manutenção do pH citoplasmático ácido, de modo a manter um nível de SsrA e SsrB~P alto e consequentemente ativar a transcrição de genes codificados dentro de SPI-2, processo importante para a sobrevivência e virulência de *Salmonella* no interior dessa célula fagocítica por excelência (Kenney, 2018). Nossos resultados do efeito do EF e ECP de *C. citroniae*, tanto em condição de aerobiose como em anaerobiose, deverá ser futuramente mais bem explorado no sentido de entender qual o papel que estes estímulos desempenham como sinais e na modulação da posterior etapa de sobrevivência e virulência da bactéria no interior dos macrófagos.

6.2.2. Sistema de dois componentes PhoPQ.

Outro TCS com papéis importantes na regulação de genes de virulência em *Salmonella* é PhoPQ. Juntos, EnvZ-OmpR e PhoPQ constituem os reguladores globais de virulência em *Salmonella*. Isso se deve ao fato desses TCS estarem envolvidos na regulação direta ou indireta de numerosos genes e processos que são pedra angular da virulência deste patógeno. No caso particular de PhoPQ, estudos mostram que aproximadamente 40 genes envolvidos diretamente com a virulência de *Salmonella* estão sob sua regulação. Genes codificados dentro das SPI-1 e SPI-2 e nos T3SS-1 e T3SS-2 são regulados em algum nível por PhoPQ (Bijlsma; Groisman, 2005). Este TCS regula a expressão dos genes de SPI-1 e em consequência a invasão de células epiteliais por *Salmonella* pelo papel importante que este tem na regulação da expressão do regulador mestre da SPI-1, *hila*. O gene *hila* é ativado transcricionalmente por três proteínas reguladoras do tipo AraC, HilC, HilD e RstA. HilD é o regulador principal do sistema, enquanto HilC e RstA atuam principalmente para amplificar o sinal de indução. O papel de PhoPQ na regulação da expressão do *hila* está relacionado com o fato de que PhoP~P bloqueia a expressão de *hila* de forma indireta, bloqueando HilD e RstA (Palmer; Kim, 2019). PhoPQ regula também a expressão dos genes de SPI-2 ao regular o TCS SsrAB, responsável pela regulação da expressão dos genes SPI-2. PhoPQ é ativado em pH ácido no interior das células fagocíticas do hospedeiro. Como resultado, os níveis de SsrA e SsrB aumentam. Como já foi descrito anteriormente, SsrB~P ativa a expressão dos genes do SPI-2 e do T3SS-2 (Palmer; Kim, 2019).

Nossos resultados de expressão de *phoQ* mostraram alguns dados curiosos. O EF e o ácido 3,4-DMB reprimiram a expressão de *phoQ* em aerobiose, sendo que no caso do ácido 3,4-DMB a repressão foi estatisticamente significativa. Curiosamente, a expressão do gene *phoQ* na presença do EF em anaerobiose foi significativamente ativada, com um nível de ativação três vezes maior do que o controle. Já o ECP de *C. cictroniae* não mostrou ter um efeito significativo na expressão desse gene. Os resultados de sequenciamento de RNA de *Salmonella* cultivada na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose corroboram os resultados de expressão gênica por RT-PCR, nos quais a HK foi significativamente reprimida, bem o RR desse TCS, que embora não conste da lista de genes reprimidos duas vezes ou mais, o nível de sua repressão foi de 1,9 vezes em relação ao controle sem ácido 3,4-DMB.

A comparação dos nossos resultados de RNAseq de *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose com os resultados de RNAseq de cepas de *Salmonella* (ST4/74 e D23580) na presença de 22 condições de estresse pela qual a bactéria passa durante o processo infeccioso (Kröger *et al.*, 2013; Canals *et al.*, 2019) mostraram que o perfil de expressão de *phoQ* foi diferente do perfil de expressão nas condições testadas nos estudos mencionados acima. Este resultado deverá ser investigado com mais detalhe futuramente pela sua relevância como um resultado novo e que pode mostrar como metabólitos produzidos pela microbiota intestinal podem ter um papel tão importante quanto as condições estressantes investigadas nos estudos citados acima.

6.2.3. Sistema de dois componentes SsrAB.

A capacidade de *Salmonella* de perceber sinais ambientais e adequar o seu estilo de vida de forma a sobreviver num ambiente complexo e competitivo como é o caso do ambiente intestinal é uma das principais armas dentro do arsenal de fatores de virulência da qual essa bactéria dispõe. Dentro do intestino há subpopulações heterogêneas de *Salmonella*, com algumas características interessantes para a sua sobrevivência e patogênese. A capacidade de invadir células epiteliais intestinais é um fator crucial para a continuidade da infecção. Porém, nem todos os indivíduos da população estão equipados para seguir um caminho de infecção sistêmica, e isso ocorre devido a heterogeneidade existente na população, isto é, ao fato de haver subpopulações que expressam e outras que não expressam alguns fatores que as tornam capazes ou não de invadir células epiteliais. O processo de invasão de células epiteliais intestinais requer

a expressão de genes codificados na SPI-1, que codifica proteínas para a montagem do T3SS-1 e proteínas efetoras transportadas por esse sistema (Desai *et al.*, 2016).

O T3SS-1 sintetiza fatores importantes como proteínas efetoras que são injetadas para o citoplasma da célula hospedeira e modulam os microtúbulos de modo que a invasão seja possível. Dentre alguns TCS que regulam a expressão dos genes do SPI-1 e T3SS-1 destaca-se o SsrAB. SsrAB funciona como um interruptor para o estilo de vida de *Salmonella*, estimulado principalmente por ambientes com pH levemente ácido. Após invadir as células epiteliais ou após ser fagocitada pelos macrófagos, *Salmonella* reside no SCV, onde o pH ácido (~pH<5) estimula e ativa a proteína quinase sensora SsrA. A autofosforilação de SsrA e consequente transferência do grupo fosforil para o seu regulador de resposta SsrB faz com que ele reprima o efeito silenciador do H-NS (proteína estruturadora de nucleóides do tipo histona) e ative a expressão dos genes codificados na SPI-2 e T3SS-2. SsrAB não é ativado no intestino pelo pH, tendo em vista a alta alcalinidade intestinal. Não havendo estímulo de pH ácido no intestino, o SsrB não é fosforilado. Porém, neste estado SsrB desempenha papel importante ao se ligar ao H-NS e reprimir o efeito silenciador deste no promotor de genes responsáveis pela formação do biofilme, como *csgD*. Com isso, na ausência de pH ácido, SsrB funciona como um regulador de formação de biofilme, permitindo à bactéria viver num estado de latência, mantendo o hospedeiro no estado de portador assintomático (Desai *et al.*, 2016; Tze *et al.*, 2019).

Os nossos resultados de expressão relativa usando RT-PCR mostraram que a expressão de *ssrA* na presença de EF, ECP de *C. citroniae* e do ácido 3,4-DMB foi significativamente reprimida tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Esse resultado é interessante tendo em vista a importância de SsrAB em processos de virulência de *Salmonella*, como na invasão de células epiteliais e na sobrevivência no interior de células fagocíticas. Embora nos resultados do sequenciamento de RNA de culturas de *Salmonella* na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose o *ssrA* não tenha aparecido na lista de genes reprimidos, o seu regulador de resposta cognato, *ssrB*, foi significativamente reprimido, cinco vezes em relação ao controle. Ademais, genes pertencentes ao T3SS-2 que codificam proteínas para a montagem do arcabouço do T3SS e proteínas transportadas por esse sistema para o citoplasma das células hospedeira tiveram um padrão de expressão bem parecido com o de *ssrB*. Esses genes estão envolvidos com funções diversas e muito importantes para a virulência da bactéria, como translocação de proteínas efetoras, chaperonas e montagem do T3SS-2. Num estudo realizado por Koeger e colaboradores em 2013, a expressão de RNA em 22 condições pelas quais *Salmonella* passa em algum estágio durante o processo infeccioso foi avaliada. Cada um desses estímulos específicos mimetiza

condições de estresse vivenciadas pela bactéria durante a infecção intestinal. Os resultados mostraram um aumento significativo (~ seis vezes) na expressão de *ssrB* na presença de condições encontradas dentro de SCV, tais como baixa concentração de Mg^{2+} , choque pelo óxido nítrico e choque pelo peróxido. Outro resultado interessante foi o fato de 27 genes do SPI-2 terem apresentado um padrão de expressão semelhante ao de *ssrB* nessas mesmas condições (Kröger *et al.*, 2013).

Comparando os nossos resultados de sequenciamento de RNA com os resultados do estudo citado acima, verificamos que o perfil de expressão (repressão) de *ssrB* é totalmente diferente do perfil de expressão de qualquer uma das condições testadas no estudo anterior. Apesar dos resultados mostrarem repressão do gene pelo efeito do ácido 3,4-DMB, o perfil de expressão de *ssrB*, de 15 genes de SPI-2 envolvidos na montagem do T3SS-2, de proteínas efetoras, chaperonas e translocon (*ssaH*, *ssaJ*, *sseA*, *sifB*, *ssaR*, *pipB2*, *sseD*, *sseB*, *sopD*, *steB*, *sseD*, *steC* e *sseC*), tiveram o mesmo perfil de expressão que *ssrB* (Tabela 4), isto é, foram todos reprimidos na presença do ácido 3,4-DMB. Isso já era de certa forma esperado, uma vez que já se sabe que estes genes são regulados por SsrB. Esta incoerência entre o não aparecimento do *ssrA* na lista de genes afetados pelo ácido 3,4-DMB, frente a um cenário de repressão significativa do seu regulador de resposta *ssrB* é um resultado interessante, visto que SsrAB é regulado por outros sistemas como PhoPQ e EnvZ-OmpR, que podem regular o sistema como um todo ou somente uma das proteínas do sistema. Um resultado interessante é que o regulador de resposta PhoP, que está envolvido na regulação de SsrAB, estava reprimido nesta condição, e isso pode explicar em parte o fato de *ssrB* estar reprimido e o sensor *ssrA* não aparecer como reprimido.

Recentemente (2019), Canals e seus colaboradores (2019) fizeram uma avaliação comparativa profunda, por meio de sequenciamento de RNA mensageiro, da expressão gênica global de duas cepas de *Salmonella*, ST313 (D23580) e ST19 (ST4/74), na presença de 16 estímulos que mimetizam as condições encontradas durante o processo infeccioso. Dentre os estímulos testados, destacam-se por exemplo choque osmótico (alta concentração de NaCl), choque por altas concentrações de sais biliares, condições de anaerobiose, características do ambiente intestinal, choque por óxido nítrico e peróxido, característica de ambiente encontrado em SCV e, por fim, as condições estressantes de estilo de vida no interior dos macrófagos (Canals *et al.*, 2019). Nesse estudo, descobriram que 677 genes e sRNAs foram diferencialmente expressos nessas duas cepas, nas 16 condições testadas. Em paralelo,

confirmaram por abordagem proteômica que a expressão diferencial desses genes refletia a nível proteico.

6.2.4. Sistema de dois componentes RcsBCD.

Diferente da maioria dos outros TCS, RcsBCD (*Regulatory System of Colanic acid capsule synthesis*) é composto por três proteínas e sua regulação é muito complexa. Este é um sistema de fosforilação que participa na regulação da resposta ao estresse bacteriano. A proteína RcsC é uma quinase sensora híbrida, que sente o sinal e se autofosforila em um resíduo histidina e o grupamento fosforil é transferido para o seu resíduo aspartato. Do resíduo aspartato, o grupo fosforil é transferido para o resíduo histidina de outra proteína do TCS, RcsD, uma histidina fosfotransferase. Por último, o grupo fosforil é transferido para o resíduo aspartato da proteína reguladora de resposta RcsB (Majdalani; Gottesman, 2006; Torrez *et al.*, 2019). O RcsB~P liga-se a uma sequência conservada de DNA localizada na região promotora para modificar a expressão de genes cujos produtos desempenham um papel vital na adaptação bacteriana durante a transição de um estilo de vida livre para colonização do hospedeiro, como genes envolvidos na síntese do polissacarídeo capsular e/ou operons flagelares e genes de invasão (Majdalani; Gottesman, 2006). Um subconjunto de genes alvos regulados por RcsB~P também requer a proteína auxiliar RcsA, cuja síntese é regulada negativamente pelo H-NS e positivamente pelas proteínas RcsA, RcsB e por uma RNA não codificadora, o DsrA, através do seu efeito na síntese de H-NS. O RcsF, uma lipoproteína, atua como um regulador positivo de RcsC; já IgaA atua como um regulador negativo e é epistático⁷ para o RcsF.

Avaliamos o efeito dos diferentes extratos e o ácido 3,4-DMB na expressão do gene *rcsC*, para tentar entender como os diferentes tipos e classes de metabólitos presentes no intestino modulam esse TCS e por consequência como esses afetariam a resposta de *Salmonella* numa situação de estresse assim como na presença desses extratos ou do ácido 3,4-DMB.

⁷Epistasia refere-se ao efeito comportamental da interação entre alelos de genes em vários *locus* que influenciam um fenótipo. Os genes podem mascarar um ao outro para que seja considerado dominante ou podem combinar para produzir uma nova característica. Se a adição dos efeitos de cada gene separadamente não predizer o efeito de dois genes, é provável que a epistasia esteja presente (Phillips, 2009).

6.3. Efeito de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* em TCS envolvidos na respiração.

O processo disbiótico causado por fatores diversos, dentre os quais processos inflamatórios agudos, não só resulta na mudança da diversidade e abundância das populações bacterianas, mas também em mudanças químicas profundas no ambiente intestinal. *Salmonella* explora nutrientes gerados especificamente a partir desses processos de disbiose para usar como fontes de energia importantes (Zeng; Inohara; Nuñez, 2017). Em *Salmonella* quatro TCS estão diretamente envolvidos na capacidade da bactéria usar aceptores alternativos de elétrons, o que lhe permite ter uma larga vantagem em termos de aquisição de energia, usando uma variedade de pequenos metabólitos presentes no ambiente intestinal, comparado aos membros da microbiota que não dispõe dessas ferramentas para aproveitamento desses metabólitos.

Os TCS envolvidos nesse importante processo são TorSR (Moore; Hendrickson, 2012; Carey *et al.*, 2018), TrtSR (Hensel *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 2010; Barrow *et al.*, 2015), NarQP (Zeng; Inohara; Nuñez, 2017), NarXL (Rivera-Chávez *et al.*, 2016; Stewart, 2003) e ArcAB (Georgellis; Kwon; Lin, 2001; Oshima *et al.*, 2002; Loui; Chang; Lu, 2009). O número de TCS envolvidos diretamente na modulação e regulação da capacidade de *Salmonella* utilizar metabólitos intestinais como aceptores alternativos de elétrons realça a importância que o processo de respiração anaeróbica tem para a adaptação, estabelecimento, competição e finalmente progressão da infecção, para a bactéria nesse ecossistema complexo e competitivo que é o ambiente intestinal (Robbiani *et al.*, 2007; Gillis *et al.*, 2018).

6.3.1. Sistemas de dois componentes TorSR e TtrSR.

Os TCS TorSR e TrtSR são responsáveis, respectivamente, pela detecção do óxido de trimetilamina (TMAO) (Carey *et al.*, 2018) e tetrionato ($S_4O_6^{2-}$) no ambiente intestinal inflamado e regulam o uso desses metabólitos como aceptores alternativos de elétrons (Knodler; Eifenbein, 2019). TorSR regula a expressão do operon *torCAD*, que codifica a enzima N-óxido de trimetilamina redutase, que permite reduzir o TMAO em trimetilamina, que é usado pela bactéria comoceptor alternativo de elétrons (Carey *et al.*, 2018). TtrSR regula a expressão do operon *ttrBCA*, que codifica a enzima tetrionato redutase (Daeffler *et al.*, 2017). A atividade do sistema respiratório TMAO redutase é regulada pelo TCS TorSR e pela proteína

periplasmática TorT, que depende estritamente da presença do TMAO no ambiente. A proteína TorT se liga ao TMAO e interage com a região N-terminal do sensor TorS (Ansaldi *et al.*, 2007).

A aquisição de nutrientes num ambiente competitivo como é o ambiente intestinal é um dos principais desafios ao estabelecimento de patógenos anaeróbios facultativos como é o caso de *Salmonella*. Este patógeno usa uma variedade de estratégias sofisticadas para competir com os membros da microbiota intestinal. Numa fase inicial da infecção intestinal, *Salmonella* é capaz de eliminar hidrogênio produzido pela microbiota para potencializar seu crescimento inicial. Os ácidos graxos de cadeia curta, produzidos pela microbiota podem modular a expressão dos genes de invasão codificados nas SPI-1 tanto de forma positiva (formato) quanto de forma negativa (butirato) (Khan, 2014). Usando os T3SS de SPI-1 e SPI-2, *Salmonella* Typhimurium tem a capacidade de promover, por um lado, a invasão e sobrevivência nas células hospedeiras e por outro lado é capaz de provocar, estrategicamente, uma resposta inflamatória no hospedeiro, o que acaba sendo uma pedra angular para que o patógeno se beneficie e prossiga nesse ambiente. A transmigração de neutrófilos para o lúmen intestinal resulta na grande produção de ROS, que oxida um composto de enxofre endógeno, o tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), que se origina da detoxificação do sulfeto de hidrogênio (H_2S) pelos enterócitos. O produto da oxidação do tiosulfato gerado durante a inflamação intestinal é o tetrionato ($S_4O_6^{2-}$), que pode servir como um acceptor de elétrons respiratório para *Salmonella* (Portaliou *et al.*, 2016; De Nisco; Rivera-Cancel; Orth, 2018). Embora a respiração usando tetrionato como acceptor alternativo de elétrons tenha sido identificada no início do século XIX, apenas recentemente foram obtidas evidências de que é importante para *Salmonella* durante a infecção (Winter *et al.*, 2010). Nesse estudo, Winter e seus colaboradores demonstraram que o $S_4O_6^{2-}$ no hospedeiro mamífero é resultado de ROS, gerada durante o processo inflamatório intestinal, como descrito acima.

A avaliação da expressão do gene *torS* na presença de EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* em aerobiose e anaerobiose usando a abordagem de RT-PCR e RNAseq gerou resultados interessantes. A expressão de *torS* foi ativada na presença de EF tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, duas vezes e três vezes em relação ao controle, respectivamente. Já o ácido 3,4-DMB teve um efeito repressor sobre a expressão de *torS* tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, sendo que a repressão em anaerobiose foi estatisticamente significativa.

Nos resultados de RNAseq de *Salmonella* cultivada na presença de ácido 3,4-DMB, o gene *torS* não consta na lista de genes que foram afetados. Porém, o gene regulador de resposta

torR (do TCS TorSR), foi reprimido significativamente 2,4 vezes comparado ao controle crescido só na presença de DMSO. Como já foi descrito anteriormente, o regulador de resposta *torR* fosforila e se torna ativo em resposta ao estímulo sentido pelo *torS*. A interrogação que fica em relação a este resultado é que se *torS* não é afetado pelo ácido 3,4-DMB, qual é a via responsável por ativar o gene *torR* e conseqüentemente o operon *torCAD*? Outra surpresa com relação a esses resultados é que todos os genes do operon *torCAD* foram superexpressos na presença de 3,4-DMB: *torC* foi ativado 122,7 vezes, *torA* 72,3 vezes e *torD* 65,1 vezes em relação ao controle. Decidimos então avaliar a expressão desses genes na presença de ácido 3,4-DMB em aerobiose usando a abordagem de RT-PCR. Embora os resultados mostrassem que a expressão do operon *torCAD* foi ativada, essa ativação foi de certa forma discreta se comparado com a ativação verificada pelos resultados de RNAseq. A expressão do gene *torA* foi ativada em 5 vezes e *torC* quatro vezes em relação ao controle. Não conseguimos determinar a expressão do gene *torD*, pois em duas tentativas, os resultados foram indeterminados.

6.3.2. Sistemas de dois componentes NarQP e NarXL.

Como resultado do processo inflamatório, citocinas são liberadas e estimulam o início de uma cascata bioquímica importante para a geração de mais aceptores alternativos de elétrons. Após a exposição aos radicais livres do superóxido, citocinas induzem a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que gera o óxido nítrico. O óxido nítrico, quando exposto ao ROS é convertido em peroxinitrito (ONOO^-) e depois em nitrato (NO_3^-). O nitrato pode ser usado exclusivamente por *Salmonella* como um acceptor alternativo de elétrons durante a respiração anaeróbica (Ansaldi *et al.*, 2007; Khan, 2014). O genoma de *Salmonella* contém três nitrato redutases periplasmáticas, codificadas pelos operons *narGHI*, *narZYV* e *napABC*, para apoiar seu crescimento no ambiente intestinal. Estudos com genes homólogos presentes em *E. coli* sugerem que a nitrato redutase A, codificada pelos genes *narGHI*, é a principal enzima que promove o crescimento, usando o nitrato como um acceptor alternativo de elétrons em ambientes anaeróbicos. Em *E. coli*, os genes *napABC* são transcritos ao máximo em condições de crescimento anaeróbico na presença de baixas concentrações de nitrato (Lopez *et al.*, 2015).

Dois TCS medeiam a capacidade de *Salmonella* de usar nitrato em ambientes anaeróbicos, os TCS NarXL e NarQP, que regulam a expressão dos genes *narGHI*, *narZYV* e *napABC*. Qualquer um dos sensores NarX e NarQ são capazes de sinalizar a presença de nitrato

para as respectivas proteínas reguladoras, NarL e NarP, respectivamente, que podem funcionar tanto como ativadores como repressores de transcrição (Rabin; Stewart, 1993). Estudos em *E. coli* mostraram que um evento de duplicação provavelmente deu origem a esses dois TCS parálogos, NarXL e NarQP, que respondem a nitrato e nitrito em condições anaeróbicas (Rabin; Stewart, 1993; Capra *et al.*, 2012). Embora os reguladores NarL e NarP compartilhem semelhanças significativas e até reconheçam locais de ligação de consenso altamente semelhantes, a evolução divergente permitiu que cada um desses reguladores de resposta reconhecesse diferentes arquiteturas de promotores e ativasse genes diferentes (Price; Dehal; Arkin, 2008).

Nossos resultados de avaliação da expressão de genes que codificam as quinases sensoras NarX e NarQ, na presença de EF e na presença do ácido 3,4-DMB, mostram um dado interessante. A expressão do gene *narX* foi significativamente reprimida na presença do EF em anaerobiose e ativada em aerobiose, mas de forma não significativa. Embora o ácido 3,4-DMB também tenha tido um efeito repressor na sua expressão, este não foi significativo, e isso pode ser explicado pelo fato de que a diversidade e complexidade de metabólitos que podem atuar de forma individual ou em sinergismo pode ter aumentado a expressão de forma significativa na presença de EF em anaerobiose. O efeito na expressão de *narQ* foi uma ativação significativa na presença de EF em anaerobiose, sendo reprimida tanto em aerobiose na presença do EF e na presença de ácido 3,4-DMB quanto em anaerobiose. Esse perfil divergente de expressão destes dois genes na presença do EF em anaerobiose é surpreendente, pois por serem semelhantes e serem estimulados pelos mesmos estímulos, esperávamos que tivessem um perfil de expressão semelhante.

6.4. Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* na expressão de genes de quinases sensores de TCS envolvidos em processos metabólicos.

Os diferentes nichos hospedeiros apresentando condições estressantes às quais *Salmonella* deve que se adaptar, sobreviver e replicar são muitos diversos e desafiadores. A evolução de *Salmonella* em termos metabólicos e fisiológicos garantiu-lhe uma flexibilidade para responder às condições do meio onde se encontra (Potts *et al.*, 2019). Por outro lado, a própria característica de anaeróbio facultativo intrínseca de *Salmonella* requer uma

flexibilidade e plasticidade genômica para responder e se adaptar metabolicamente a essas duas condições ambientais antagônicas (Woalder, 2017). Vários TCS estão envolvidos na regulação de processos metabólicos importantes para o sucesso na adaptação, sobrevivência e replicação da bactéria. Dentre os TCS que estão de alguma forma envolvidos com algum processo metabólico importante durante o processo infeccioso, destacam-se DcuSR, CitAB, GlnKR/QseEF, BarA-SirA, CreCB, PhoBR e GlnLG, como mostra a Tabela 1. Os TCS acima mencionados estão envolvidos com: metabolismo de C4-decarboxilatos, como succinato, fumarato, molato, aspartato e tartarato (DcuSR) (Janausch; Garcia-Moreno; Unden, 2002; Abo-Amer *et al.*, 2004); fermentação de citrato (CitAB) (Yamamoto *et al.*, 2008); metabolismo de amino açúcar (GlnKR) (Reichenbach; Göpel; Görke, 2009); metabolismo central de carbono (BarA-SirA) (Binnenkade; Lassak; Thormann, 2011; Martinez; Leone; Chang, 2017); regulação de fosfato e resposta às fontes de carbono glicolítico (CreCB) (Scholten; Tommassen, 1993; Godoy *et al.*, 2016); homeostase de fosfato inorgânico (PhoBR) (Tommassen *et al.*, 1984; Pontes; Groisman, 2018;) e sobrevivência em condições limitadas de nitrogênio (GlnLG) (Pahel; Rothstein; Magasanik, 1982).

Os nossos resultados mostraram alguns achados interessantes, pois diferente dos HK dos outros TCS, a maior parte dos TCS envolvidos com o metabolismo não foram significativamente afetados pela presença do EF, ECP de *C. citroniae* e do ácido 3,4-DMB, com exceção de *citA*, *creC* e *phoR*, afetados significativamente na presença do EF em aerobiose, na presença do ECP de *C. citroniae* tanto em aerobiose quanto em anaerobiose e na presença de EF em anaerobiose. Esses resultados de expressão relativa avaliadas por PCR em tempo real de amostras crescidas na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose, corroboraram os resultados do sequenciamento de RNA, onde não foram encontrados genes dos TCS envolvidos com o processo de metabolismo. Assim, decidimos não nos aprofundar na discussão dos resultados nesta seção, visto que na literatura esses TCS envolvidos com metabolismo, cujos genes HK foram afetados, não parecem ser TCS críticos para a virulência e patogênese bacteriana.

6.5. Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* na expressão de genes de quinases sensores de TCS envolvidos em processos de transporte.

Muitos dos TCS de *Salmonella* estão envolvidos na regulação de sistemas de transporte de compostos importantes, principalmente fontes de carbono. Dos TCS de *Salmonella* já descritos como reguladores de sistemas de transporte destacam-se: TctED que regula o transporte de tricarboxilato (Winnen; Hvorup; Saier, 2003); UhpAB que regula o transporte de glicose 6-fosfato (Glc-6-P), frutose 6-fosfato (Fru-6-P) e fosfato hexose (Faralla *et al.*, 2014; Webber; Kadner, 1997); PgtAB no transporte de fosfoglicerato (Niu; Jiang; Hong, 1995) e KdpDE que regula o sistema de transporte de potássio (Freeman; Dorus; Waterfield, 2013; Schramke *et al.*, 2016). Com exceção do gene UhpB, do TCS UhpAB, os outros genes HK dos TCS envolvidos com processos de transporte não foram significativamente afetados em nossos experimentos.

6.6. Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* na expressão de genes de quinases sensores de TCS envolvidos na resposta ao estresse e tolerância a metais pesados.

Compostos antibacterianos, metais pesados como chumbo e zinco são alguns dos exemplos de compostos presentes no ambiente externo das bactérias no geral e *Salmonella* em particular. Esses compostos, além de causar estresse nos envelopes, são bactericidas. Deste modo, ao longo do processo evolutivo, as bactérias desenvolveram sistemas e mecanismos para evitar esses compostos no seu interior quando entram no seu citoplasma. Os TCS envolvidos na resistência a múltiplos antibióticos em *Salmonella* são: BaeSR e BasSR (Kato *et al.*, 2003; Nishino; Nikaido; Yamaguchi, 2007; Karavolos *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2012). O TCS HydHG está envolvido com a tolerância de *Salmonella* a metais pesados como chumbo e zinco (Chopra; Peterson; Prasad, 1991; Leonhartsberger *et al.*, 2001). Independente das condições, tipo de extrato presente e do ácido 3,4-DMB, os genes HK dos TCS envolvidos com a resposta ao estresse e tolerância a metais pesados não foram significativamente afetados quer em aerobiose como em anaerobiose.

6.7. Efeito do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae* na expressão de genes de quinases sensores de TCS envolvidos com quimiotaxia e *quorum sensing*.

Perceber as condições do ambiente externo e interpretar os sinais específicos recebidos permite a bactéria executar vários processos importantes, como a mobilidade, quimiotaxia e equilibrar a densidade e dinâmica populacional bem como interações bacterianas nos biofilmes através do processo de *quorum sensing*. Em *Salmonella* os TCS CheAB e o QseCB estão envolvidos com a quimiotaxia (Blat *et al.*, 1998; Mcnamara; Wolfe, 1997; Sandoz; Mitzimberg; Schuster, 2007; Asfahl; Schuster, 2017) e com processos de *quorum sensing* (Pullinger *et al.*, 2010; Weigel; Demuth, 2016; Jimenez; Sperandio, 2019), respectivamente.

Em outras bactérias, como por exemplo *Pseudomonas aeruginosa*, a detecção de quorum controla centenas de genes, muitos dos quais codificam fatores de virulência extracelular. A detecção de *quorum* é necessária para a virulência desta bactéria em modelos animais. Já foi mostrado que subpopulações de *P. aeruginosa* com deficiência na detecção de *quorum* por carregar uma mutação no gene que codifica LasR, regulador central de detecção do *quorum*, são frequentemente isoladas de infecções agudas e crônicas (Sandoz; Mitzimberg; Schuster, 2007).

Nossos resultados mostraram que o *qseC*, que codifica a proteína QseC, HK no TCS QseCB, foi significativamente ativada na presença do EF quer em aerobiose como e anaerobiose. Já o *cheA* foi reprimido nessas condições e ativado de forma significativa na presença do ácido 3,4-DMB. Ao comparar os nossos resultados de expressão de *cheA* obtidos por PCR em tempo real e os resultados de RNAseq de *Salmonella* crescida na presença de EF (Antunes *et al.*, 2014), verificamos uma diferença, pois os nossos resultados mostraram uma ligeira repressão na presença de EF quer em aerobiose como e anaerobiose, enquanto os resultados de RNAseq na presença de EF em aerobiose apresentou uma ativação de 3 vezes quando comparado ao seu controle. Outros genes envolvidos no processo de quimiotaxia também tiveram suas expressões ativadas, como são os casos de *cheY* e *cheZ*. Nos nossos resultados de RNAseq, na presença do ácido 3,4-DMB, o gene *cheA* não consta da lista dos genes que foram afetados. Porém, nos resultados do RNAseq na presença de EF (Antunes *et al.*, 2014) *cheA* aparece ativado de forma significativa.

6.8. Expressão gênica global de *Salmonella* na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose, EF e ácido 3,4-DMB em anaerobiose

Uma das formas de ter um entendimento geral de como uma condição de estresse pode afetar fatores de virulência de uma bactéria é através da avaliação da sua expressão gênica global por meio de sequenciamento do RNA mensageiro. As nossas análises mostraram resultados interessantes ao mesmo tempo que levantaram muitas outras perguntas que merecem uma atenção mais profunda futuramente.

Vimos que genes que codificam proteínas importantes para a virulência de *Salmonella* tiveram suas expressões afetadas de forma significativa e com perfil semelhante como são exemplo os genes codificados dentro do SPI-1 e SPI-2 que tiveram suas expressões reprimidas em todas as condições mencionadas acima. Esses resultados corroboram com os resultados do trabalho de Antunes *et al.*, 2014, em que mostraram que os metabólitos presentes em extratos fecais humanos (EF) reprimiam de forma significativa a expressão de genes SPI-1 quando a *Salmonella* era cultivada em aerobiose. Vimos também que a condição que reprimiu, de forma significativa (duas vezes ou mais em relação ao controle), maior número genes é o EF em anaerobiose. Um total de 255 genes foram reprimidos, comparados aos 91 e 94 genes reprimidos de forma significativamente na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose e aerobiose, respectivamente. Quase 15% dos 255 genes reprimidos na presença do EF em anaerobiose, são codificados dentro do SPI-1, importantes para a capacidade de *Salmonella* invadir células epiteliais intestinais, uma etapa chave para sua virulência e patogênese.

A análise dos resultados de RNAseq na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose, mostrou que quatro dos seis genes codificados dentro do SPI-4, que regulam a capacidade de adesão às células hospedeiras foram significativamente reprimidos. Junto com o SPI-1 o SPI-4 desempenham papéis complementares na interação entre *Salmonella* e a mucosa intestinal (Main-Hester K L, *et al.*, 2008). Alguns genes TCS foram reprimidos nas condições testadas, porém, um dos resultados que nos chamou atenção e que deixou no ar perguntas para serem investigadas futuramente é que genes envolvidos com o processo de resistências a múltiplos antibióticos, bem como compostos químicos tóxicos, solventes orgânicos e agentes de estresse oxidativo (Matin R. G. e Rosner J. L., 1995; Alekshun M. N. e Levy S. B., 1999) tiveram suas respectivas expressões ativadas, como são os casos do *marA*, *marR*, *marB* e *emrB*. Esses genes são codificados dentro do operon *marRAB*, que está presente na maioria das bactérias da família dos *Enterobacteriaceae*, muitos dos quais patógenos intestinais humanos. Estudos em *E. coli*

mostraram que esse operon é induzido por: tetraciclina, cloranfenicol, solícilato de sódio e outros compostos não relacionados (Martin R. G. *et al.*, 1996). Sob condições não indizíveis, MarR liga a duas repetições diretas, os sítios I e II dentro do operador *mar* (*marO*) e impede a transcrição do operon *marRAB*. Já em ensaios *in vitro*, a proteína MarR é negativamente afetado pelo solícilato de sódio e por compostos químicos que possuem anéis fenólicos. A proteína MarA, para além de ativar a expressão do operon *mraRAB*, regula também a expressão de muitos outros genes, constituintes do regulon *mar*, como são os casos de genes necessários para o reparo do DNA e tráfego de lipídeos que, são positivamente regulados pelo MarA. Desta forma, o *mar* reduz o dano ao DNA induzidos por quinolonas e a capacidade das tetraciclinas de atravessar a membrana externa das bactérias (Sharma Tarteek *et al.*, 2017; Will W. R. e Fang C. F. 2020). Estudo analisando o transcriptoma de *Salmonella* cultivado sob condições de estresse ácido, mostrou que 14 genes associados à resistência a AMPs foram significativamente ativados pela exposição ao ácido, desses, havia alguns genes do TCS como *phoQ*, *cpxA* e *basS*, bem como o *marA* e *marR* que já foram relatado serem importantes para a sobrevivência de *Salmonella choleraesuis* em um ambiente ácido e rico em sais biliares (Lee J. J., *et al.*, 2015; Li Cao, *et al.*, 2019). Em outro estudo mostraram que o regulon *mar* (*marA* e *marR*) são significativamente ativados em biofilmes quando comparados às células pantônicas (Chin K. C. J., *et al.*, 2017).

6.9. Sobrevivência de *Salmonella* em macrófagos.

A abordagem de sequenciamento de RNA mensageiro gera resultados importantes que nos permitem entender em parte como uma condição ou estímulo afeta a expressão de um determinado gene e a função da proteína por ela codificada. Traçamos como objetivo do nosso trabalho usar essa abordagem e isso nos permitiu ter um conjunto de dados interessantes que nos deu o perfil de expressão gênica de *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose. Desses resultados viu-se que grande parte dos genes que foram significativamente afetados haviam sido reprimidas. Grande parte estava envolvida diretamente com fatores de virulência críticos para a patogênese bacteriana, como são os casos dos genes das SPI-1 e SPI-2. Vários estudos têm vindo a usar a abordagem de transcriptoma para acessar informações de expressões gênicas importantes (Kroger *et al.*, 2013.; Antunes *et al.*, 2014; Srikumar *et al.*; 2015.; Canals *et al.*; 2019.; Knodler *et al.*; 2019). Isso nos deu a possibilidade de acessar e comparar nossos resultados com os resultados disponíveis em bases de dados.

A compreensão do processo de infecção sistêmica por *Salmonella* exige, necessariamente, uma compreensão profunda da sua interação com células epiteliais intestinais, com células imunológicas como os neutrófilos e sobre os macrófagos que desempenham um papel importante na eliminação de microrganismos invasores que atingem a corrente sanguínea. A dinâmica de *Salmonella* que invade, sobrevive, prolifera e mata os macrófagos é central para a patogênese da bactéria. Um fator importante que devemos ter em conta nessa interação entre *Salmonella* com macrófagos é que, ao encontrar um macrófago, a probabilidade dessa bactéria infectar o macrófago é notavelmente baixa: menos de 5% (Gog *et al.*, 2012), devido a heterogeneidade em termos de susceptibilidade ao primeiro evento de infecção. Isso nos faz pensar que para a infecção de macrófagos tenha sucesso, há a necessidade de uma carga bacteriana grande e eventos sucessivos de contato entre *Salmonella* e macrófagos (Gog *et al.*, 2012).

Como já mencionado nesse trabalho, *Salmonella* tem um conjunto de fatores que lhe permite invadir e sobreviver em células hospedeiras e esses fatores são codificados em SPI, com destaque para as SPI-1 e SPI-2, respectivamente. Pelas abordagens de PCR em tempo real e RNAseq, viu-se que grande parte dos genes codificados nessas SPI tem sua expressão profundamente afetada, sendo a maior parte dos que foram afetados reprimidos na presença tanto de EF (Antunes *et al.*, 2014), como também na presença de ácido 3,4-DMB. Além disso, vários outros TCS foram afetados, e é certo que precisaríamos de outras abordagens, como construções de mutantes para genes importantes que foram afetados, para descobrirmos qual seria o real efeito da perda de um fator importante para a capacidade de sobrevivência de *Salmonella* no interior dos macrófagos. Porém, nossos resultados abrem várias janelas e possibilidades para entender mais a fundo os efeitos *in vitro* de EF, ECP de *C. citroniae* e do ácido 3,4-DMB na sobrevivência intracelular de *Salmonella* em macrófagos.

Estudos anteriores do nosso grupo já tinham avaliado o efeito do EF e do ECP de *C. citroniae* (Antunes *et al.*, 2014), bem como do ácido 3,4-DMB (Peixoto *et al.*, 2017) na capacidade de *Salmonella* invadir células epiteliais intestinais (células HeLa), porém, o efeito destes na sobrevivência de *Salmonella* no ambiente intracelular dos macrófagos não haviam sido testados. Nossos resultados mostraram que a capacidade de sobrevivência foi afetada AM ambos os casos, apresentando uma reduzida capacidade de sobreviver nos macrófagos, principalmente na presença do EF e do ECP de *C. citroniae*, que apresentaram um perfil semelhante, embora, parece que o ECP de *C. citroniae* afeta mais profundamente esse fenótipo. Já os resultados na de sobrevivência na presença do ácido 3,4-DMB nos apontam para na

direção de que ela não exerce um efeito significativo na perda ou ganho de capacidade de sobrevivência, porém acreditamos que esse resultado pode ser repetido de forma a que possamos concluir com mais rigor, o real efeito desse metabólito presente no EF na sobrevivência de Salmonella no interior dos macrófagos.

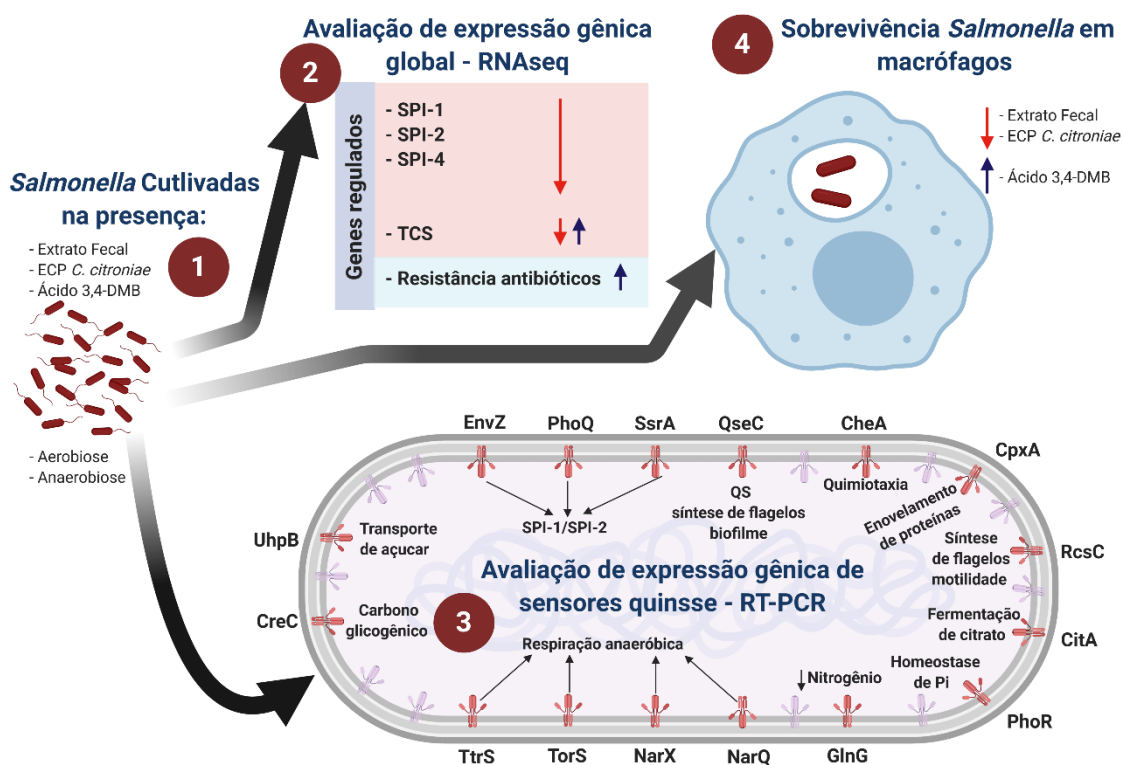
CONCLUSÃO

Chegamos a várias conclusões interessantes e por outro lado várias janelas e caminhos para projetos de pesquisas futuras foram abertas com esse trabalho. Das conclusões mais relevantes desse trabalho destacamos os seguintes:

- 1) A presença do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*, não afetaram o crescimento de *Salmonella* tanto em aerobiose como em anaerobiose;
- 2) A avaliação da expressão de genes HK de TCS de *Salmonella* cultivadas na presença do EF, ácido 3,4-DMB e ECP de *C. citroniae*, mostrou que estes, regularam de forma diferencial e estatisticamente significativo, a expressão destes genes com destaque para os genes envolvidos com processos de virulência, tais como:
 - a. Respiração anaeróbica, *narX*, *narQ*, *ttrS* e *torS*;
 - b. Processo de invasão de células epiteliais intestinais, *envZ* e *PhoQ*;
 - c. Sobrevivência no interior de células hospedeiras (epiteliais intestinais e macrófagos), *envZ*, *phoQ* e *ssrA*;
 - d. *Quorum sensing*, *qseC*
- 3) A avaliação da expressão gênica de *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em aerobiose mostrou regulação de forma positiva (ativação) e negativa (repressão) a expressão dos seguintes genes:
 - a. Genes ativados, genes envolvidos com resistência a antibióticos (*marA*, *marB* e *marR*) e alguns enzimas metabólicas importantes;
 - b. Genes reprimidos, genes codificados no SPI-1 e T3SS-1, SPI-2 e genes TCS (*ssrA* e *ssrB*).
- 4) A avaliação da expressão gênica de *Salmonella* cultivada na presença do ácido 3,4-DMB em anaerobiose mostrou regulação de forma positiva (ativação) e negativa (repressão) a expressão dos seguintes genes:
 - a. Genes ativados, genes envolvidos com resistência a antibióticos (*marA*, *marR*);
 - b. Genes reprimidos, genes SPI-1 e T3SS-1, SPI-4 e TCS e *mig-14* (gene de resistência a antibiótico)
- 5) A avaliação da expressão gênica de *Salmonella* cultivada na presença do EF em anaerobiose mostrou regulação de forma positiva (ativação) e negativa (repressão) a expressão dos seguintes genes:

- a. Genes ativados, genes envolvidos com resistência a antibióticos (*marA*, *marR* e *emrB*);
 - b. Genes reprimidos, genes SPI-1 e T3SS-1, SPI-2, TCS (*pmrA*, *pmrB*, *phoQ*, *ssrA* e *ssrB*).
- 6) O EF na diluição 1/2 (EF/RPMI) afeta a viabilidade dos macrófagos, porém diluições menores do EF não tem efeito na viabilidade deles.
- 7) Os resultados do ácido 3,4-DMB não nos permitiu concluir qual o efeito destes na viabilidade dos macrófagos, teremos que repetir esse experimento para concluir como a viabilidade dos macrófagos é afetada.
- 8) Os ensaios de sobrevivência de *Salmonella* no interior de macrófagos, mostrou:
 - a. EF e ECP de *C. citroniae* inibem a capacidade de sobrevivência de *Salmonella* em macrófagos, com destaque para o ECP de *C. citroniae* inibiu de forma significativa;
 - b. O 3,4-DMB, parece favorecer a sobrevivência de *Salmonella* em alguns *Time points*, porém teremos que repetir esse experimento para concluir melhor esse efeito.

Figura 51. Resumo dos principais resultados do trabalho



Legenda: Esquema sintetizando os principais resultado do projeto. 1) O EF, ácido 3,4-DMB e o ECP de *C. citroniae* não afetaram o crescimento de *Salmonella* em aerobiose e anaerobiose. 2) Avaliação da expressão gênica por RNAseq nessas três condições tanto em aerobiose como anaerobiose, mostrou que genes importantes para virulência (invasão, respiração, sobrevivência etc.) foram significativamente regulados, a seta vermelha mostras os genes que foram reprimidos enquanto a seta azul mostra os genes que foram ativados. 3) Mostra os genes sensores quinase que tiveram suas expressões significativamente regulados na em pelo menos uma das condições, EF, ácido 3,4-DMB ou ECP de *C. citroniae* em aerobiose ou anaerobiose. 4) A capacidade de sobrevivência de *Salmonella* no interior dos macrófagos foi inibida pelo EF e ECP de *C. citroniae* enquanto o ácido 3,4-DMB parece favorecer essa capacidade.

REFERÊNCIAS

- Abo-Amer AE.; Munn J.; Jackson K.; Aktas M.; Golby P.; Kelly DJ.; Andrews SC. DNA Interaction and Phosphotransfer of the C4-Dicarboxylate-Responsive DcuS-DcuR Two-Component Regulatory System from *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 6, p. 1879–1889, mar. 2004.
- Alegre, M.-L.; Mannon, R. B.; Mannon, P. J. The Microbiota, the Immune System, and the Allograft: Microbiota, Immune System and Allograft. **American Journal of Transplantation**, v. 14, n. 6, p. 1236–1248, jun. 2014.
- Allaire, Joannie M.; Crowley.; Shauna M.; Law.; Hong T; Chang, Sun-young.; Ko, Hyun-jeong.; Vallance, Bruce A.; The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 9, p. 677–696, 2018.
- Anderson, C. J.; Kendall, M. M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium strategies for host adaptation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–16, 2017.
- Ansaldi M.; Théraulaz L.; Baraquet C.; Panis G, Méjean V. Aerobic TMAO respiration in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 484–494, 2007.
- Antunes, L. C. M.; Julie A. K.; McDonald; Schroeter K.; Carlucci C.; Ferreira R. B. R.; Wang M.; Yurist-Doutsch S.; Hira G.; Jacobson K.; Davies J.; Allen-Vercoe E.; Finlay B. B. Antivirulence activity of the human gut metabolome. TL - 5. **mBio**, v. 5 VN-re, n. 4, p. 14, 2014.
- Antunes L.C.; Han J.; Ferreira R.B.; Lolić P.; Borchers C.H.; Finlay B.B.; Effect of Antibiotic Treatment on the Intestinal Metabolome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1494–1503, abr. 2011.
- Asfahl, K. L.; Schuster, M. Social interactions in bacterial cell-cell signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 1, p. 92–107, 2017.
- Ashari K.S.; Roslan N.S.; Omar A.R.; Bejo M.H.; Ideris A.; Mat Isa N. Genome sequencing and analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Stanley UPM 517: Insights on its virulence-associated elements and their potentials as vaccine candidates. **PeerJ**, v. 2019, n. 6, 2019.
- Avershina E.; Slangsvold S.; Simpson M. R.; Storro O.; Johnsen R.; Øien T.; Rudi K. Diversity of vaginal microbiota increases by the time of labor onset. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017.
- Avram Sanders, D.; Mendez, B.; Koshland, D. E. Role of the CheW protein in bacterial chemotaxis: Overexpression is equivalent to absence. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 11, p. 6271–6278, 1989.

- Bäckhed F.; Ley R.E.; Sonnenburg J.L.; Peterson D.A.; Gordon J.I. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine - supplemental materials. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915–1920, 2005.
- Baggi, G.; Bernasconi, S.; Zangrossi, M. Initial steps in the degradation of 3,4-dimethylbenzoic acid by *Pseudomonas putida* strain DMB. **FEMS Microbiology Letters**, v. 137, n. 2–3, p. 129–134, 1996.
- Bajaj V.; Lucas R.L.; Hwang C; Lee C.A. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. **Mol. Microbiol.** v. 22, p. 703–714, 1996.
- Bajaj, V.; Hwang, C.; Lee, C. A. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. **Mol. Microbiol.** v. 18, p. 715–727, 1995.
- Banda M. M.; Zavala-Alvarado C.; Pérez-Morales D.; Bustamante V. H. SlyA and HilD counteract H-NS-mediated repression on the *ssrAB* virulence operon of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and thus promote its activation by *OmpR*. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 8, p. 1–14, 2019.
- Barrow P. A.; Berchieri A.; O. Neto C. F.; Lovell M. The contribution of aerobic and anaerobic respiration to intestinal colonization and virulence for *Salmonella typhimurium* in the chicken. **Avian Pathology**, v. 44, n. 5, p. 401–407, 2015.
- Bauer M. A. Kainz K.; Carmona-Gutierrez D.; Madeo F. Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. **Microbial Cell**. v. 5, n. 5, p. 215–219, 2018.
- Baxter, M. A.; Jones, B. D. Two-component regulators control *hilA* expression by controlling *fimZ* and *hilE* expression within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 978–985, 2015.
- Bearson, B. L.; Bearson, S. M. D. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 4, p. 271–278, 2008.
- Besser, J. M. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. **Food Microbiology**, v. 71, p. 55–59, 2018.
- Bijlsma, J. J. E.; Groisman, E. A. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. **Mol. Microbiol.** v. 57, p. 85–96, 2005.
- Binnenkade, L.; Lassak, J.; Thormann, K. M. Analysis of the BarA/UvrY two-component system in *Shewanella oneidensis* MR-1. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.
- Blaser, M. J. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 544–545, 2016.
- Blaser, M. J.; Falkow, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 887–894, 2009.

- Blat Y.; Gillespie B.; Bren A.; Dahlquist F.W.; Eisenbach M. Regulation of phosphatase activity in bacterial chemotaxis. **Journal of molecular biology**, v. 284, n. 4, p. 1191–1199, 1998.
- Bliska, J. B.; Van Der Velden, A. W. M. *Salmonella* “Sops” up a preferred electron receptor in the inflamed intestine. **mBio**, v. 3, n. 4, p. 4–6, 2012.
- Boesch, K. C.; Silversmith, R. E.; Bourret, R. B. Isolation and characterization of nonchemotactic CheZ mutants of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 12, p. 3544–3552, 2000.
- Bordi C.; Théraulaz L.; Méjean V.; Jourlin-Castelli C. Anticipating an alkaline stress through the Tor phosphorelay system in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 48, n. 1, p. 211–223, 2003.
- Botero L. E.; Delgado-Serrano L.; Hernández M. L. C.; Obando P.D. P.; Eder M. M. Z. The Human Microbiota: The Role of Microbial Communities in Health and Disease. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, n. 1, p. 5–15, 2015.
- Bott, M. Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. **Archives of Microbiology**, v. 167, n. 2–3, p. 78–88, 1997.
- Bouskra D.; Brézillon C.; Bérard M.; Werts C.; Varona R.; Boneca IG.; Eberl G. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 507–510, 2008.
- Bustamante V.H.; Martínez L.C.; Santana F.J.; Knodler L.A.; Steele-Mortimer O.; Puente J.L. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 38, p. 14591–14596, 2008.
- Canals R.; Hammarlo D.; Kroger C.; Owen S. V.; Fong W. Y.; Lacharme-Lora L.; Zhu N X.; Wenner S. E.; Carden, J.; Honeycutt D. M.; Kingsley M. R.A.; Brownridge P.; Chaudhuri R. R.; Will P.; Rowe M.; Predeus A.V.; Hokamp K.; Melita A.; Gordon J.; Hinton C. D. Adding function to the genome of African *Salmonella Typhimurium* ST313 strain D23580. **PlosBiology**. v. 17, p. 1-32, 2019.
- Cani P. D.; Van Hul M.; Lefort C.; Depommier C.; Rastelli M.; Everard A. Microbial regulation of organismal energy homeostasis. **Nature Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 34–46, 2019.
- Capra E.J.; Perchuk B.S.; Skerker J.M.; Laub M,T. Adaptive mutations that prevent crosstalk enable the expansion of paralogous signaling protein families. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 222–232, 2012.
- Capra, E. J.; Laub, M. T. Evolution of two-component signal transduction systems. NIH Public Access. **Annu Rev Microbiol.**, v. 66, p. 325–347, 2012.

Carey J. N.; Metttert E. L.; Roggiani M.; Myers K. S.; Kiley P. J.; Goulian M. Regulated Stochasticity in a Bacterial Signaling Network Permits Tolerance to a Rapid Environmental Change. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 196–207.e14, 2018.

Cash H. L.; Whitham C. V.; Behrendt C. L.; Hooper L. V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1126–1130, 2006.

Cao L, Wang J, Sun L, Kong Z, Wu Q, Wang Z. (2019), Transcriptional analysis reveals the relativity of acid tolerance and antimicrobial peptide resistance of *Salmonella*. **Microb Pathog**. 136:103701.

Cerf-Bensussan, N.; Gaboriau-Routhiau, V. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 10, p. 735–744, 2010.

Chakraborty S.; Sivaraman J.; Leung K. Y.; Mok Y. K. Two-component PhoB-PhoR regulatory system and ferric uptake regulator sense phosphate and iron to control virulence genes in type III and VI secretion systems of *Edwardsiella tarda*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 45, p. 39417–39430, 2011.

Chakraborty, S.; Mizusaki, H.; Kenney, L. J. A FRET-Based DNA Biosensor Tracks OmpR-Dependent Acidification of *Salmonella* during Macrophage Infection. **PlosBiology**. p. 1–32, 2015.

Chen M. C.; Wang S. Y.; Kuo H. C.; I-Lin Tasi. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. **Journal of the Formosan Medical Association**, 2018.

Chin K.C.J., Taylor T.D., Hebrard M., Anbalagan K., Dashti M.G., Phua K.K. (2017), Transcriptomic study of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhi biofilm. **BMC Genomics**, 18 p. 836

Chopra, A. K.; Peterson, J. W.; Prasad, R. Cloning, and sequence analysis of hydrogenase regulatory genes (hydHG) from *Salmonella typhimurium*. **BBA - Gene Structure and Expression**, v. 1129, n. 1, p. 115–118, 1991.

Cianci R.; Pagliari D.; Piccirillo C. A.; Fritz J. H.; Cambassi G. The Microbiota and Immune System Crosstalk in Health and Disease. **Hindawi**. v. 2018, p. 10–12, 2018.

Clarke M. B.; Hughes D. T.; Zhu C.; Boedeker E. C.; Sperandio V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. **PANS**. v. 103, p. 10420–10425, 2006.

Coburn, B.; Grassl, G. A.; Finlay, B. B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 112–118, 2007.

Cordeiro R. P.; Krause D. O.; Doria J. H.; Holley R.A. Role of the BaeSR two-component regulatory system in resistance of *Escherichia coli* O157: H7 to allyl isothiocyanate. **Food Microbiology**, v. 42, p. 136–141, 2014.

Craig L. M.; Charles O. E.; Robin D. Hatton Casey T. W. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231–241, 2012.

Cresci, G. A. M.; Izzo, K. Gut Microbiome. **Nutricion in Clinical Practice**, v. 30, p. 45–54, 2019.

Curtis M. M.; Russell R.; Moreira C. G.; Adebesein A. M.; Wang C.; Williams N. S.; Taussig R.; Stewart D.; Zimmermann P.; Lu B.; Prasad R. N.; Zhu C.; Rasko D. A.; Huntley J. F.; Falck J. R.; Sperandio V. QseC inhibitors as an antivirulence approach for gram-negative pathogens. **mBio**, v. 5, n. 6, p. 1–11, 2014.

Daeffler K. N.; Galley J. D.; Sheth R. U.; Ortiz-Velez L. C.; Bibb C. O.; Shroyer N F.; Britton R. A.; Tabor J. J. Engineering bacterial thiosulfate and tetrathionate sensors for detecting gut inflammation. **Molecular Systems Biology**, v. 13, n. 4, p. 923, 2017.

Dana Elhadad, Prerak Desai, Guntram A. Grassl, M. M. G. R. AND O. G.-M. Differences in Host Cell Invasion and *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Expression between *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi A and Nontyphoidal *S. Typhimurium*. **Infect Immun**. v. 84, n. 4, p. 1150–1165, 2016.

Darkoh C.; Plants-Paris K.; Bishoff D.; DuPont H. L. *Clostridium difficile* Modulates the Gut Microbiota by Inducing the Production of Indole, an Interkingdom Signaling and Antimicrobial Molecule. **mSystems**, v. 4, n. 2, p. 1–11, 2019.

Davies S. J.; Golby P.; Omrani D; Broad S. A.; Harrington V L.; Guest J. R.; Kelly D. J.; Andrews S. C. Inactivation and regulation of the aerobic C4-dicarboxylate transport (dctA) gene of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 18, p. 5624–5635, 1999.

De la Cruz M. A.; Pérez-Morales D.; Palacios I. J.; Fernández-Mora M.; Calva E.; Bustamante V. H. The two-component system CpxR/A represses the expression of *Salmonella* virulence genes by affecting the stability of the transcriptional regulator HldD. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. AUG, p. 1–14, 2015.

DE Nisco, N. J.; Rivera-Cancel, G.; Orth, K. The biochemistry of sensing: Enteric pathogens regulate type iii secretion in response to environmental and host cues. **mBio**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2018.

Desai S. K.; Winardhi R. S.; Periasamy S.; Dykas M. M.; Jie Y.; Kenney L. J. The horizontally acquired response regulator SsrB drives a *Salmonella* lifestyle switch by relieving biofilm silencing. **eLife**, v. 5, n. FEBRUARY2016, p. 1–23, 2016.

Dev Alexander Mitrophanov, G. Y.; Groisman, E. A.; Mitrophanov, A. Y. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems Collections Topic Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. **Cold Spring Harbor Laboratory Press on September**, v. 1, p. 2601–2611, 2014.

Dons L.; Olsen J. E.; Rasmussen O. F. Dons L.; Olsen J. E.; Rasmussen O. F. Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* genes encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. **DNA Sequence**, v. 29, n. 1, p. 2011, 1994.

Duong N.; Osborne S.; Bustamante V. H.; Tomljenovic A. M.; Puente J. L.; Coombes B. K. Thermosensing coordinates a cis-regulatory module for transcriptional activation of the

intracellular virulence system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 47, p. 34077–34084, 2007.

Drecktrah D.; Knodler L. A.; Howe D.; Steele-Mortimer O. *Salmonella* Trafficking is Defined by Continuous Dynamic Interactions with the Endolysosomal System. **Traffic**, v. 8, p. 212–225, 2007.

Ellermeier, C. D.; Ellermeier, J. R.; Slauch, J. M. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Mol. Microbiol.** v. 57, p. 691–705, 2005.

Ellermeier C. D., Slauch J. M., RtsA and RtsB Coordinately Regulate Expression of the Invasion and Flagellar Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 17, p. 5096–5108, 2003.

Ellermeier, J. R.; Slauch, J. M. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 24–29, 2007.

Fabrega, A.; Vila, J. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308–341, abr. 2013.

Fàbrega, A.; Vila, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308–341, 2013.

Faralla C.; Metruccio M. M.; De Chiara M.; Mu R.; Patras K. A.; Muzzi A.; Grandi G.; Margarit I.; Doran K. S.; Janulczyk R. Analysis of two-component systems in group B *Streptococcus* shows that RgfAC and the novel FspSR modulate virulence and bacterial fitness. **mBio**, v. 5, n. 3, p. 1–12, 2014.

Fawcner-Corbett, D.; Simmons, A.; Parikh, K. Microbiome, pattern recognition receptor function in health and inflammation. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 31, n. 6, p. 683–691, 2017.

Feng X.; Oropeza R.; Kenney L. J. OmpR Phosphorylation and Its Role in Signaling and Pathogenesis. **ASM News**, v. 69, n. 8, p. 390–395, 2003.

Ferric C. F.; Frawley R. E.; Tapscott T.; Vázquez-Torres A. Discrimination and Integration of Stress Signals by Pathogenic Bacteria. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

Fraher, M. H.; Toole, P. W. O.; Quigley, E. M. M. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. June 2012.

Francis, V. I.; Stevenson, E. C.; Porter, S. L. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 11, p. 1–22, 2017.

Freeman, Z. N.; Dorus, S.; Waterfield, N. R. The KdpD/KdpE Two-Component System: Integrating K⁺ Homeostasis and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.

GAO, R.; STOCK, A. M. Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 133–154, out. 2009.

Gao, R.; Stock, A. M. Quantitative kinetic analyses of shutting off a two-component system. **mBio**, v. 8, n. 3, p. 1–15, 2017.

Garmendia J.; Beuzón C. R.; Ruiz-Albert J.; Holden D. W. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2385–2396, 2003.

Garrity, L. F.; Ordal, G. W. Chemotaxis in *Bacillus subtilis*: How bacteria monitor environmental signals. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 87–104, 1995.

Gart E. V.; Suchodolski J. S.; Welsh T. H. Jr.; Alaniz RC.; Randel R. D.; Lawhon S. D. *Salmonella typhimurium* and multidirectional communication in the gut. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–18, 2016.

Georgellis, D.; Kwon, O.; Lin, E. C. C. Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. **Science**, v. 292, n. 5525, p. 2314–2316, 2001.

Gerlach, R. G.; Hensel, M. *Salmonella* Pathogenicity Islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 120, n. 7–8, p. 317–327, 2007.

Gilbert J. A.; Blaser M. J.; Caporaso J. G.; Jansson J. K.; Lynch S. V.; Knight R. Current understanding of the human microbiome. **Nature Medicine**, v. 24, n. 4, p. 392–400, 2018.

Gill S. R.; Pop M.; Deboy R.T.; Eckburg P. B.; Turnbaugh P. J.; Samuel B. S.; Gordon J. I.; Relman D. A.; Fraser-Liggett C. M.; Nelson K. E. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355–1359, 2006.

Gillis C. C.; Hughes E. R.; Spiga L.; Winter M .G.; Zhu W.; Furtado de Carvalho T.; Chanin R. B.; Behrendt C. L.; Hooper L. V.; Santos R. L.; Winter S. E. Dysbiosis-Associated Change in Host Metabolism Generates Lactate to Support *Salmonella* Growth Article Dysbiosis-Associated Change in Host Metabolism Generates Lactate to Support *Salmonella* Growth. **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 1, p. 54- 64.e6, 2018.

Godoy M. S.; Nikel P. I.; Cabrera Gomez J. G.; Pettinari M. J. The CreC Regulator of *Escherichia coli*, a New Target for Metabolic Manipulations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 244–254, jan. 2016.

Gog J. R.; Murcia A.; Osterman N.; Trevelyan O. R.; Mark J. M.; Sarra S.; Bin A.; Pietro W.; James M.; Wood L. N.; Maskell D J.; Cicuta P.; Bryant C. E. Dynamics of *Salmonella* infection of macrophages at the single cell level. **The Royal Society**, v. 9 , p. 2696–2707, 2012.

Grice E. A.; Segre J. A. The skin microbiome. NIH Public Access. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5931, p. 1190–1192, 2010.

Grice, E. A.; Segre, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–253, 2011.

Grimont, P.A.D., F-X. Weill. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **WHO**, 2007.

Groban E. S.; Clarke E. J.; Salis H. M.; Miller S. M.; Voigt C. A. Kinetic Buffering of Cross Talk between Bacterial Two-Component Sensors. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 3, p. 380–393, 2009.

Groisman, E. A.; Mouslim, C. Sensing by bacterial regulatory systems in host and non-host environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 705, 2006.

Guerrero P.; Collao B.; Morales E. H.; Calderón I. L.; Ipinza F.; Parra S.; Saavedra C. P.; Gil F. Characterization of the BaeSR two-component system from *Salmonella* Typhimurium and its role in ciprofloxacin-induced *mdtA* expression. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 6, p. 453–460, 2012.

Guerrero P.; Collao B.; Álvarez R.; Salinas H.; Morales E. H.; Calderón I. L.; Saavedra C. P.; Gil F. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium BaeSR two-component system positively regulates *sodA* in response to ciprofloxacin. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART 10, p. 2049–2057, 2013.

Gunn, J. S. *Salmonella* host-pathogen interactions. **Front Microbiol.**2: 191, 2011

Hallstrom, K. N.; McCormick, B. A. Pathogenicity Islands. In: **Molecular Medical Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 303–314.

Hartman, C. E.; Samuels, D. J.; Karls, A. C. Modulating *Salmonella* Typhimurium's Response to a Changing Environment through Bacterial Enhancer-Binding Proteins and the RpoN Regulon. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 3, n. August, p. 1–9, 2016.

Hensel M.; Hinsley A. P.; Nikolaus T.; Sawers G.; Berks B. C. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 275–287, 1999.

Hooper, L. V.; Gordon, J. I. Commensal Relationships in the gut. **Ecology and Evolution of Infection**, v. 292, n. 5519, p. 1115–1118, 2009.

Huang L.; Xu W.; Su Y.; Zhao L.; Yan Q. Regulatory role of the RstB-RstA system in adhesion, biofilm production, motility, and hemolysis. **MicrobiologyOpen**, p. e00599, mar. 2018.

Ilyas, B.; Tsai, C. N.; Coombes, B. K. Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.

Island, M. D.; Kadner, R. J. Interplay between the membrane-associated UhpB and UhpC regulatory proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 16, p. 5028–5034, 1993.

- Jair K. W., Martin R. G., Rosner J. L., Fujita N., Ishihama A., Wolf R.E. Jr. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. **J Bacteriol.** 1995 Dec;177(24):7100-4.
- Janausch, I. G.; Garcia-Moreno, I.; Unden, G. Function of DcuS from *Escherichia coli* as a Fumarate-stimulated Histidine Protein Kinase *in Vitro*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39809–39814, out. 2002.
- Jandhyala S. M.; Talukdar Ru.; Subramanyam C.; Vuyyuru H.; Sasikala M.; Reddy D. N. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.
- Ji Y.; Li W.; Zhang Y.; Chen L.; Zhang Y.; Zheng X.; Huang X.; Ni B. Microbial Pathogenesis QseB mediates bio film formation and invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 6–11, 2017.
- Jimenez, A. G.; Sperandio, V. **Quorum Sensing and the Gut Microbiome**. Elsevier Inc., cap. 6, p. 151-169, 2019.
- Jones, B. D. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43 Spec No, n. February, p. 110–7, 2005.
- Jourlin C.; Bengrine A.; Chippaux M.; Méjean V. An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N-oxide in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 20, n. 6, p. 1297–1306, 1996.
- Karavolos M. H.; Spencer H.; Bulmer D. M.; Thompson A.; Winzer K.; Williams P.; Hinton J. C.; Khan C. M. Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–14, 2008.
- Karu N.; Deng L.; Slae M.; Guo A. C.; Sajed T.; Huynh H.; Wine E.; Wishart D. S. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. **Analytica Chimica Acta**, v. 1030, p. 1–24, 2018.
- Kato A.; Latifi T.; Groisman E. A. Closing the loop: The PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4706–4711, 2003.
- Karatan E.; Saulmon M. M.; Bunn M. W.; Ordal G. W. Phosphorylation of the response regulator CheV is required for adaptation to attractants during *Bacillus subtilis* chemotaxis. **The Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 47, p. 43618–43626, 2001
- Kenney, L. J. The role of acid stress in *Salmonella* pathogenesis. **Science Direct**, v. 1, 2018.
- KHAN, C. M. A. The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. **International scholarly research notices**, v. 2014, p. 846049, 2014.

- Khorchid, A.; Ikura, M. Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 38, n. 3, p. 307–312, 2006.
- Kim S. J.; Kim SH.; Kim J. H.; Hwang S.; Yoo H. J. Understanding Metabolomics in Biomedical Research. **Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 1, p. 7, 2016.
- Kimbrough, T. G.; Miller, S. I. Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. **Microbes Infect.** v. 4, p. 75–82, 2002.
- Klein G.; Stupak A.; Biernacka D.; Wojtkiewicz P.; Lindner B.; Raina S. Multiple transcriptional factors regulate transcription of the rpoE Gene in *Escherichia coli* under different growth conditions and when the lipopolysaccharide biosynthesis is defective. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 44, p. 22999–23019, 2016.
- Knight R.; Callewaert C.; Marotz C.; Hyde E. R.; Debelius J. W.; McDonald D.; Sogin M. L. The Microbiome and Human Biology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 18, n. 1, p. 65–86, 2017.
- Knodler, L. A.; Elfenbein, J. R. New roles for two-component system response regulators of *Salmonella enterica* serovar Typhi during host cell interactions. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 964–965, 2019.
- Kong, S.; Zhang, Y. H.; Zhang, W. Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. **Hindawi**, v. 2018, p. 1-10, 2018.
- Koushik P.; Vincent N.; William C. C.; David F. B.; and Rasika M. H. The c-di-GMP Binding Protein YcgR Controls Flagellar Motor Direction and Speed to Affect Chemotaxis by a “Backstop Brake” Mechanism. **Mol Cell**. v. 23, p. 1-7, 2010.
- Kröger C.; Colgan A.; Srikumar S.; Händler K.; Sivasankaran S. K.; Hammarlöf D. L.; Canals R.; Grissom J. E.; Conway T.; Hokamp K.; Hinton J. C. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Cell Host and Microbe**, v. 14, n. 6, p. 683–695, 2013.
- Kuhle, V.; Hensel, M. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: Functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 22, p. 2812–2826, 2004.
- Lamas A.; Miranda J. M.; Regal P.; Vázquez B.; Franco CM.; Cepeda A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. **Microbiological Research**, v. 206, n. September 2017, p. 60–73, 2018.
- Langdon, A.; Crook, N.; Dantas, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, 2016.
- Larock, D. L.; Chaudhary, A.; Miller, S. I. Salmonellae interactions with host processes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 191–205, 2015.

Lawley, T. D.; Walker, A. W. Intestinal colonization resistance. **Immunology**, v. 138, n. 1, p. 1–11, 2013.

Lazar V.; Ditu L. M.; Pircalabioru G. G.; Gheorghe I.; Curutiu C.; Holban A. M.; Picu A.; Petcu L.; Chifiriuc M. C. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1–18, 2018.

Lee, A. K.; Detweiler, C. S.; Falkow, S. OmpR Regulates the Two-Component System SsrA-SsrB in *Salmonella* Pathogenicity Island 2. **J. Bacteriology**. v. 182, n. 3, p. 771–781, 2000.

Lee J. J., Hsuan S. L., Kuo C. J., Wu Y. C., Chen T. H. (2015), MarA and *ramA* regulate virulence in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. **Vet. Microbiol.**, 181 pp. 323-327.

Leonhartsberger S.; Huber A.; Lottspeich F.; Böck A. The *hydH/G* Genes from *Escherichia coli* Code for a Zinc and Lead Responsive Two-component Regulatory System. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 1, p. 93–105, 2001.

Ley, R. E.; Peterson, D. A.; Gordon, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 837–848, 2006.

Li H.; Liu F.; Peng W.; Yan K.; Zhao H.; Liu T.; Cheng H.; Chang P.; Yuan F.; Chen H.; Bei W. The CpxA/CpxR Two-Component System Affects Biofilm Formation and Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, mar. 2018.

Liu Y.; Ho K. K.; Su J.; Gong H.; Chang A. C.; Lu S. Potassium transport of *Salmonella* is important for type III secretion and pathogenesis. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. 8, p. 1705–1719, 2013.

Lloyd-Price, J.; Abu-Ali, G.; Huttenhower, C. The healthy human microbiome. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2016.

Lobato-Márquez D.; Molina-García L.; Moreno-Córdoba I.; García-Del Portillo F.; Díaz-Orejas R. Stabilization of the Virulence Plasmid pSLT of *Salmonella* Typhimurium by Three Maintenance Systems and Its Evaluation by Using a New Stability Test. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 3, n. October, p. 1–11, 2016.

Lopez C. A.; Rivera-Chávez F.; Byndloss M. X.; Bäumlner A. J. The periplasmic nitrate reductase NapABC supports luminal growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium during colitis. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 9, p. 3470–3478, 2015.

Lostroh, C. P.; Lee, C. A. The HilA Box and Sequences outside It Determine the Magnitude of HilA-Dependent Activation of P(*prgH*) from *Salmonella* Pathogenicity Island 1. **J. Bacteriology**. v. 183, n. 16, p. 4876–4885, 2001.

Lou L.; Zhang P.; Piao R.; Wang Y. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. **Frontiers**. v. 9, n. July, p. 1–12, 2019.

- Loui, C.; Chang, A. C.; Lu, S. Role of the ArcAB two-component system in the resistance of *Escherichia coli* to reactive oxygen stress. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–14, 2009.
- Lucas R. L.; Lostroh C. P.; DiRusso C. C.; Spector M. P.; Wanner B. L.; Lee C. A. Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **J. Bacteriology**, v. 182, n. 7, p. 1872–1882, 2000.
- Lucas, R. L.; Lee, C. A. Roles of *hilC* and *hilD* in Regulation of *hilA* Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **J. Bacteriology**. v. 183, n. 9, p. 2733–2745, 2001.
- Lucchini S.; Rowley G.; Goldberg M. D.; Hurd D.; Harrison M.; Hinton J. C. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 8, p. 0746–0752, 2006.
- Main-Hester KL, Colpitts KM, Thomas GA, Fang FC, Libby SJ. (2008) Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infect Immun**.76(3):1024-35.
- Majdalani, N.; Gottesman, S. The Rcs Phosphorelay: A Complex Signal Transduction System. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 379–405, 2006.
- Malik-Kale P.; Jolly C. E.; Lathrop S.; Winfree S.; Luterbach C.; Steele-Mortimer O. *Salmonella*- at home in the host cell. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. JUNE, p. 1–9, 2011.
- Marchesi J. R.; Adams D. H.; Fava F.; Hermes G. D.; Hirschfield G. M.; Hold G.; Quraishi M. N.; Kinross J.; Smidt H.; Tuohy K. M.; Thomas L. V.; Zoetendal E. G.; Hart A. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. p. 330–339, 2016.
- Marcus S. L.; Brumell J. H.; Pfeifer C. G.; Finlay B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: Big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 145–156, 2000.
- Martinez, K. B.; Leone, V.; Chang, E. B. Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked? **Gut Microbes**, v. 8, n. 2, p. 130–142, 2017.
- Matysik S.; Ivanne C.; Roy L.; Liebisch G.; Paule Claus S;. Metabolomics of fecal samples: A practical consideration. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 244–255, 2016.
- Mcnamara, B. P.; Wolfe, A. J. Coexpression of the long and short forms of CheA, the chemotaxis histidine kinase, by members of the family Enterobacteriaceae. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 5, p. 1813–1818, 1997.
- Méresse S.; Unsworth K. E.; Habermann A.; Griffiths G.; Fang F.; Martínez-Lorenzo M. J.; Waterman S. R.; Gorvel J. P.; Holden D. W. Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 567–577, 2001.

- Merighi M.; Carroll-Portillo A.; Septer A. N.; Bhatiya A.; Gunn J. S. Role of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Two-Component System PreA/PreB in Modulating PmrA-Regulated Gene Transcription. **J. Bacteriology**. v. 188, n. 1, p. 141–149, 2006.
- Michael N. Alekshun and Stuart B. Levy, (1999), The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. **Trends In Microbiology**, Vol. 7 NO. 10.
- Moore, J. O.; Hendrickson, W. A. In Asymmetry-to-Symmetry Switch in Signal Transmission by the Histidine Kinase Receptor for TMAO. **Structure/Folding and Design**, v. 20, n. 4, p. 729–741, 2012.
- Murret-Labarthe C.; Kerhoas M.; Dufresne K.; Daigle France. New roles for two-component system response regulators of *Salmonella enterica* serovar Typhi during host cell interactions. **bioRxiv**. 820332; in press doi: <https://doi.org/10.1101/820332> in press. 2019.
- Navarre W. W.; Porwollik S.; Wang Y.; McClelland M.; Rosen H.; Libby S. J.; Ferri C. F. Selective Silencing of Foreign DNA with Low GC Content by the H-NS Protein in *Salmonella*. **Science**. v. 313, (5784), 236-238.
- Nelson, K.; Whittam, T. S.; Selander, R. K. Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 88, n. August, p. 6667–6671, 1991.
- Neu, J. The microbiome during pregnancy and early postnatal life. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 373–379, 2016.
- Nicholson J. K.; Holmes E.; Kinross J.; Burcelin R.; Gibson G.; Jia W.; Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, v. 108, p. 1262–1268, 2012.
- Nishino, K.; Nikaido, E.; Yamaguchi, A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 9066–9075, 2007.
- Niu, S.; Jiang, S.-Q.; Hong, J. *Salmonella typhimurium* *pgtB* mutants conferring constitutive expression of phosphoglycerate transporter *pgtP* independent of *pgtC*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 15, p. 4297–4302, 1995.
- O’Hara, A. M.; Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO Reports**, v. 7, n. 7, p. 688–693, 2006.
- Olivera, B. C. L.; Ugalde, E.; Martínez-Antonio, A. Regulatory dynamics of standard two-component systems in bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 264, n. 2, p. 560–569, 2010.
- Oshima T1.; Aiba H.; Masuda Y.; Kanaya S.; Sugiura M.; Wanner B. L.; Mori H.; Mizuno T. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 281–291, 2002.
- Owen, K. A.; Casanova, J. E. *Salmonella* manipulates autophagy to “serve and protect”. **Cell Host and Microbe**, v. 18, n. 5, p. 517–519, 2015.

Pahel, G.; Rothstein, D. M.; Magasanik, B. Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 150, n. 1, p. 202–213, 1982.

Palmer, A. D.; Kim, K. PhoP-Mediated Repression of the SPI1 Type 3 Secretion System in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Journal of bacteriology**, v. 201, n. 16, p. 1–15, 2019.

Papanikolaou N., Trachana K., Theodosiou T., Promponas V. J. and Iliopoulos I. Gene socialization: Gene order, GC content and gene silencing in Salmonella. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1–10, 2009.

Pardo-Esté C.; Hidalgo A. A.; Aguirre C.; Briones A. C.; Cabezas C. E.; Castro-Severyn J.; Fuentes J. A.; Opazo C. M.; Riedel C. A.; Otero C.; Pacheco R.; Valvano M. A.; Saavedra C. P. The ArcAB two-component regulatory system promotes resistance to reactive oxygen species and systemic infection by *Salmonella* Typhimurium. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–20, 2018.

Park, S.-Y.; Groisman, E. A. Signal-specific temporal response by the *Salmonella* PhoP/PhoQ regulatory system: Mg²⁺ transporter MgtA enhances PhoP-P levels. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 135–144, jan. 2014a.

Park, S. Y.; Groisman, E. A. Signal-specific temporal response by the *Salmonella* PhoP/PhoQ regulatory system. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 135–144, 2014b.

Peixoto R. J. M.; Alves E. S.; Wang M.; Ferreira R. B. R.; Granato A.; Han J.; Gill H.; Jacobson K.; Lobo L. A.; Domingues R. M. C. P.; Borchers CH.; Davies J. E.; Finlay B. B.; Antunes L. C. M. Repression of *Salmonella* host cell invasion by aromatic small molecules from the human fecal metabolome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 19, 2017.

Perrett, C. A.; Zhou, D. *Salmonella* type III effector SopB modulates host cell exocytosis. **Emerging Microbes and Infections**, v. 2, n. 000, p. 0, 2013.

Pescaretti Mde L.; Farizano J. V.; Morero R.; Delgado M. A. A Novel Insight on Signal Transduction Mechanism of RcsCDB System in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72527, set. 2013.

Phillips, P. C. and Evolution of Genetic Systems. **Nature Review Genetics**, v. 9, n. 11, p. 855–867, 2009.

Pontes, M. H.; Groisman, E. A. Protein synthesis controls phosphate homeostasis. **Genes and Development**, v. 32, n. 1, p. 79–92, 2018.

Poole, R. K. Advances in Bacterial Electron Transport Systems and Their Regulation. **Elsevier** V. 68, p. 594, 1^a Ed., Hardcover ISBN: 9780128048238; eBook ISBN: 9780128052396, 2016.

Portaliou A. G.; Tsolis K. C.; Loos M. S.; Zorzini V.; Economou A. Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 175–189, 2016.

Porter S. L.; Wadhams G. H.; Armitage J. P. Signal processing in complex chemotaxis pathways. **Nature Reviews in Microbiology**. v. 9, p. 153-165, 2011.

Potts A. H.; Guo Y.; Ahmer B. M. M.; Romeo T. Role of CsrA in stress responses and metabolism important for *Salmonella* virulence revealed by integrated transcriptomics. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–30, 2019.

Pozzolini M.; Scarfi S.; Benatti U.; Giovine M. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. **Analytical Biochemistry**, v. 313, n. 2, p. 338–341, 2003.

Price, M. N.; Dehal, P. S.; Arkin, A. P. Horizontal gene transfer and the evolution of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–20, 2008.

Pulido-Landínez, M. Food safety - *Salmonella* update in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, n. January, p. 53–58, 2019.

Pullinger G. D.; Van Diemen P. M.; Dziva F.; Stevens M. P. Role of two-component sensory systems of *Salmonella enterica* serovar Dublin in the pathogenesis of systemic salmonellosis in cattle. **Microbiology**, v. 156, n. 10, p. 3108–3122, 2010.

Pursley B. R.; Hinshaw K. C.; Waters C. M. Chandler J. R.; L. C. M. Antunes Microbial Signaling. **Molecular Diversity of Environmental Prokaryotes**, p. 147, 2016.

Rabin, R. S.; Stewart, V. Dual Response Regulators (NarL and NarP) Interact with Dual Sensors (NarX and NarQ) To Control Nitrate- and Nitrite-Regulated Gene Expression in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 11, p. 3259–3268, 1993.

Rajakovich, L. J.; Balskus, E. P. Metabolic functions of the human gut microbiota: The role of metalloenzymes. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 4, p. 593–625, 2019.

Ramos-Morales, F. Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. **ISRN Cell Biology**, 2012.

Reichenbach, B.; Göpel, Y.; Görke, B. Dual control by perfectly overlapping σ_{54} - and σ_{70} -promoters adjusts small RNA GlmY expression to different environmental signals. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1054–1070, 2009a.

Reichenbach, B.; Göpel, Y.; Görke, B. Dual control by perfectly overlapping σ_{54} - and σ_{70} -promoters adjusts small RNA GlmY expression to different environmental signals. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1054–1070, 2009b.

Rigottier-Gois, L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: The oxygen hypothesis. **ISME Journal**, v. 7, n. 7, p. 1256–1261, 2013.

Rivera-Chávez F.; Zhang L. F.; Faber F.; Lopez C. A.; Byndloss M. X.; Olsan E. E.; Xu G.; Velazquez E. M.; Lebrilla C. B.; Winter S. E.; Bäuml A. J. Depletion of Butyrate-Producing

Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of *Salmonella*. **Cell Host and Microbe**, 2016.

Roggiani, M.; Goulian, M. Oxygen-dependent cell-to-cell variability in the output of the *Escherichia coli* *tor* phosphorelay. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 12, p. 1976–1987, 2015.

Ruiz-Albert J.; Garmendia J. 1.; Beuzón C. R.; Holden D. W. The roles of SsrA – SsrB and OmpR – EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system Printed in Great Britain. **Microbiology**, p. 2385–2396, 2003.

Ryan D.; Pati N. B.; Ojha U. K.; Padhi C.; Ray S.; Jaiswal S.; Singh G. P.; Mannala GK.; Schultze T.; Chakraborty T.; Suar M. Global Transcriptome and Mutagenic Analyses of the Acid Tolerance Response of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 23, p. 8054–8065, 2015.

Rychlik, I.; Barrow, P. A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p. 1021–1040, 2005.

Saini, S.; Rao, C. V. SprB Is the molecular link between *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2459–2462, 2010.

Sandoz, K. M.; Mitzimberg, S. M.; Schuster, M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 40, p. 15876–15881, 2007.

Sévellec Y, Vignaud M-L, Granier SA, Lailler R, Feurer C, Le Hello S, Mistou M-Y and Cadel-Six S (2018) Polyphyletic Nature of *Salmonella enterica* Serotype Derby and Lineage-Specific Host-Association Revealed by Genome-Wide Analysis. **Front. Microbiol.** 9:891. doi: 10.3389/fmicb.2018.00891, 2018.

Sekirov I.; Russell S. L.; Antunes L. C.; Finlay B. B. Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 90(3), p. 859–904, 2010.

Singh Y.; Saxena A.; Kumar R.; Saxena M. K. Virulence System of *Salmonella* with Special Reference to *Salmonella enterica*. **Salmonella - A Re-emerging Pathogen**, 2018.

Sommer, M. O. A.; Dantas, G.; Church, G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. **Science**, v. 325, n. 5944, p. 1128–1131, 2016

Schauber J.; Svanholm C.; Termén S.; Iffland K.; Menzel T.; Scheppach W.; Melcher R.; Agerberth B.; Lührs H.; and Gudmundsson G. H. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. **BMJ Journal**, v. 52(5): 735–741, 2003.

Scheu P. D.; Witan J.; Rauschmeier M.; Graf S.; Liao Y.-F.; Ebert-Jung A.; Basché T.; Erker W.; Undena G. CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system In vivo. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 636–645, 2012

Scholten, M.; Tommassen, J. Topology of the PhoR protein of *Escherichia coli* and functional analysis of internal deletion mutants. **Molecular microbiology**, v. 8, n. 2, p. 269–275, 1993.

Schramke H.; Tostevin F.; Heermann R.; Gerland U.; Jung K. A Dual-Sensing Receptor Confers Robust Cellular Homeostasis. **Cell Reports**, v. 16, n. 1, p. 213–221, 2016.

Sharma P., Haycocks J. R.J., Middlemiss A. Kettles D., R. A., Sellars L. E., Ricci V., Pidcock L. J.V. & Grainger D. C., (2017). The multiple antibiotic resistance operon of enteric bacteria controls DNA repair and outer membrane integrity. **Nat Commun** **8**, 1444

Smith C.; Stringer A. M.; Mao C.; Palumbo M. J.; Wade J. T; Mapping the regulatory network for *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion. **mBio**, v. 7, n. 5, p. 1–14, 2016.

Stecher, B. The Roles of Inflammation, Nutrient Availability, and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. **Metabolism and Bacterial Pathogenesis**, p. 297–320, 2015.

Stecher B.; Robbiani R.; Walker A. W.; Westendorf A. M.; Barthel M.; Kremer M.; Chaffron S.; Macpherson A. J.; Buer J.; Parkhill J.; Dougan G. Von Mering C.; Hardt W. D. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Compete with the Intestinal Microbiota. **PLoS Biol.** v. 5, n. 10, 2007.

Stecher, B.; Berry, D.; Loy, A. Colonization resistance and microbial ecophysiology: Using gnotobiotic mouse models and single-cell technology to explore the intestinal jungle. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 793–829, 2013.

Stewart, V. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. **Biochemical Society Transactions**, v. 31(1), p.1-10, 2003.

Stewart, V.; Bledsoe, P. J. Synthetic *lac* Operator Substitutions for Studying the Nitrate- and Regulatory Systems of *Escherichia coli* K-12. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2104–2111, 2003.

Szurmant H.; Ordal G. W. Diversity in Chemotaxis Mechanisms among the Bacteria and Archaea. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 68, n. 2, p. 301–319, 2004.

Taylor, P. K.; Zhang, L.; Mah, T.-F. Loss of the Two-Component System TctD-TctE in *Pseudomonas aeruginosa* Affects Biofilm Formation and Aminoglycoside Susceptibility in Response to Citric Acid. **mSphere**, v. 4, n. 2, p. 1–15, 2019.

Teplitski, M.; Goodier, R. I.; Ahmer, B. M. M. Pathways Leading from BarA / SirA to Motility and Virulence Gene Expression in *Salmonella*. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7257–7265, 2003.

Thiennimitr P.; Winter S. E.; Winter M. G.; Xavier M. N.; Tolstikov V.; Huseby D. L.; Sterzenbach T.; Tsolis R. M.; Roth J. R.; Bäumler A. J. Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 42, p. 17480–17485, 2011.

Tiwari S.; Jamal S. B. Hassan S. S.; Carvalho P. V. S. D.; Almeida S.; Barh D.; Ghosh P.; Silva A.; Castro T. L. P.; Azevedo V. Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. October, p. 1–7, 2017.

Tomljenovic-Berube A. M., Mulder D. T.; Whiteside, M. D.; Fiona S. L.; Brinkman, Coombes B. K. Identification of the regulatory logic controlling *Salmonella* pathoadaptation by the SsrA-SsrB two-component system. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 3, 2010.

Tommassen J.; Heimstra P.; Overduin P.; Lugtenberg B. Cloning of *phoM*, a gene involved in regulation of the synthesis of phosphate limitation inducible proteins in *Escherichia coli* K12. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 195, n. 1–2, p. 190–194, 1984.

Torrez M. F. L.; Farizano J. V.; Lopez F. E.; Zamora M. G.; M.; Pescaretti M. M.; Delgado M. A. Biochimie Cross-talk between the RcsCDB and RstAB systems to control STM1485 gene expression in *Salmonella* Typhimurium during acid-resistance response. v. 160, p. 46–54, 2019.

Tran T. K.; Qiang-Qiang H.; Shi Y.; Guo L. A comparative proteomic analysis of *Salmonella* Typhimurium under the regulation of the RstA / RstB and PhoP / PhoQ systems. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 12, p. 1686–1695, 2016.

Turroni S.; Fiori J.; Rampelli S.; Schnorr S. L.; Consolandi C.; Barone M.; Biagi E.; Fanelli F.; Mezzullo M.; Crittenden A. N.; Henry A. G.; Brigidi P.; Candela M. Fecal metabolome of the Hadza hunter-gatherers: A host-microbiome integrative view. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–9, 2016.

Tze L. A. F.; Foo Y. H.; Gao Y.; Zangoui P.; Singh M. K.; Gulvady R.; Kenney L. J. Single cell, super-resolution imaging reveals an acid pH-dependent conformational switch in SsrB regulates. **eLIFE**, p. 1–26, 2019.

Uchiya K.; Barbieri M. A.; Funato K.; Shah A. H.; Stahl P. D.; Groisman E. A. *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 14, p. 3924–3933, jul. 1999.

Ursell L. K.; Haiser H. J.; Van Treuren W.; Garg N.; Reddivari L.; Vanamala J.; Dorrestein P. C.; Turnbaugh P. J.; Knight R. The intestinal metabolome: An intersection between microbiota and host. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1470–1476, 2014.

Utsumi, R. (ED.). Bacterial signal transduction: networks and drug targets. New York: Austin, Tex: Springer Science+Business Media; **Landes Bioscience**, 2008.

Wang B.; Yao M.; Lv L.; Ling Z.; Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71–82, 2017.

Wang L. C.; Morgan L. K.; Godakumbura P.; Kenney L. J.; Anand G. S. The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 11, p. 2648–2659, 2012.

- Wang Z.; Klipfell E.; Bennett B. J.; Koeth R.; Levison B. S.; DuGar B.; Feldstein A. E.; Britt E. B.; Fu X.; Chung Y.; Wu Y.; Schauer P.; Smith J. D.; Allayee, H.; Tang W. H. W.; DiDonato J.A.; Lusis A. J.; Hazen S. L. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 57–65, 2011.
- Warren Y. A.; Tyrrell K. L.; Citron D. M.; Goldstein E. J. *Clostridium aldenense* sp. nov. and *Clostridium citroniae* sp. nov. isolated from human clinical infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2416–2422, 2006.
- Webber, C. A.; Kadner, R. J. Involvement of the amino-terminal phosphorylation module of UhpA in activation of uhpT transcription in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 1039–1048, 1997.
- Weigel, W. A.; Demuth, D. R. QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 379–397, 2016.
- Widenhorn, K. A.; Somers, J. M.; Kay, W. W. Expression of the Divergent Tricarboxylate Transport Operon (tctl) of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 7, p. 3223–3227, 1988.
- Wiles T. J.; Jemielita M.; Baker R. P.; Schlomann B. H.; Logan S. L.; Ganz J.; Melancon E.; Eisen J. S.; Guillemin K.; Parthasarathy R. Host Gut Motility Promotes Competitive Exclusion within a Model Intestinal Microbiota. **PlosBiology**, p. 1–24, 2016.
- Will W. R. and Fang F. C. (2020), The evolution of MarR family transcription factors as counter-silencers in regulatory networks. **Current Opinion in Microbiology**, 55:1–8.
- Winnen, B.; Hvorup, R. N.; Saier, M. H. The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 7, p. 457–465, 2003.
- Winter S. E.; Thiennimitr P.; Winter M. G.; Butler B. P.; Huseby D. L.; Crawford R. W.; Russell J. M.; Bevins C. L.; Adams L. G.; Tsolis R. M.; Roth J. R.; Bäumlér A. J. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**, v. 467, n. 7314, p. 426–429, 2010.
- Wotzka, S. Y.; Nguyen, B. D.; Hardt, W. D. *Salmonella* Typhimurium Diarrhea Reveals Basic Principles of Enteropathogen Infection and Disease-Promoted DNA Exchange. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 4, p. 443–454, 2017.
- Wu, H. J.; Wu, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 1, p. 4–14, 2012.
- Yamamoto K.; Matsumoto F.; Oshima T.; Fujita N.; Ogasawara N.; Ishihama A. Anaerobic Regulation of Citrate Fermentation by CitAB in *Escherichia coli*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 11, p. 3011–3014, 2008.
- Zaidi, M. B.; Macías, C. L.; Calva, E. Estudios Mexicanos sobre *Salmonella*: Epidemiología, vacunas y biología molecular. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 48, n. 2, p. 121–125, 2006.

Zeng, M. Y.; Inohara, N.; Nuñez, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 18–26, 2017.

Zhang L. F.; Rivera-Chávez F.; Faber F.; Lopez C. A.; Byndloss M. X.; Olsan E. E.; Xu G.; Velazquez E. M.; Lebrilla C. B.; Winter S. E.; Bäumlér A. J. Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of *Salmonella*. **Cell Host Microbe**. v.19(4) p. 443–454, 2016.

Zhou L.; Lei X. H.; Bochner B. R.; Wanner B. L. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. **J Bacteriol**, v. 185, n. 16, p. 4956–4972, 2003.

ANEXO A – Condições que mimetizam o processo infeccioso Kröger *et al.* (2013)

Estímulo	Descrição
EEP	Fase de crescimento exponencial precoce (EEP; OD ₆₀₀ 0,1) em LB
MEP	Fase de crescimento exponencial médio (MEP; OD ₆₀₀ 0,3) em LB
LEP	Fase de crescimento exponencial tardia (LEP; OD ₆₀₀ 1,0) em LB
ESP	Fase estacionária inicial (ESP, OD ₆₀₀ 2,0) em LB
LSP	Fase estacionária tardia (LSP, OD ₆₀₀ 2,0 + 6h) em LB
25°C	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3 a 25 °C
Choque térmico (15°C)	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois transferida de 37°C para 15°C por 10 min
Tempo 10 minutos	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3 a 25°C e depois transferida para 37°C por 10 min
Tempo 20 minutos	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3 a 25 °C e depois transferido para 37°C por 20 min
Choque ácido forte (pH 3)	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois as células foram colhidas por centrifugação, resuspendidas em LB fresco (pH 3,0) e cultivadas por mais 10 min
Choque ácido leve (pH 5,8)	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois as células foram colhidas por centrifugação, resuspendidas em LB fresco (pH 5,8) e cultivadas por mais 10 minutos
Choque NaCl	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois se adicionou NaCl a uma concentração final de 0,3 M e cultivadas por 10 min
Choque por sais biliares	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois se adicionou bile a uma concentração final de 3% e cultivadas por 10 min
Limitação de Fe ²⁺	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois se adicionou 2,2'-dipiridil a uma concentração final de 0,2 mM e cultivadas por 10 min
Choque anaeróbico	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3 (50 ml), cultivadas em tubo de Falcon fechado de 50 ml e incubado sem agitação a 37°C por 30 min
Crescimento anaeróbico	Crescimento estático em LB até OD ₆₀₀ 0,3 em um tubo Falcon de 50 ml completamente cheio e fechado

Choque aeróbico	Crescimento estático em LB até OD ₆₀₀ 0,3 em um tubo Falcon de 50 ml completamente cheio e fechado e, em seguida, 15 min de crescimento aeróbico sob agitação a 250 rpm
NonSPI2	Crescimento em meio PCN (pH 7,4, 25 µM Pi) para OD ₆₀₀ 0,3
InSPI2	Crescimento em meio PCN (pH 5,8, 0,4 µM Pi) para OD ₆₀₀ 0,3
InSPI2 ↓ [Mg ²⁺]	Crescimento em meio PCN (InSPI2) com MgSO ₄ 10 µM a OD ₆₀₀ 0,3
Choque peróxido (InSPI2)	Crescimento em PCN (InSPI2) para OD ₆₀₀ 0,3, depois adição de H ₂ O ₂ à concentração final de 1 µM de H ₂ O ₂ por 12 min
Oxido nítrico (InSPI2)	Crescimento em meio PCN (InSPI2) para OD ₆₀₀ 0,3, depois adição de <i>Spermine</i> NONO até 250 µM por 20 min

ANEXO B - Condições que mimetizam o processo infeccioso Canals *et al.* (2019)

	Estímulo	Descrição
Condições de crescimento <i>in vitro</i>	EEP	Fase de crescimento exponencial precoce (EEP; OD ₆₀₀ 0,1) em LB
	MEP	Fase de crescimento exponencial médio (MEP; OD ₆₀₀ 0,3) em LB
	LEP	Fase de crescimento exponencial tardia (LEP; OD ₆₀₀ 1,0) em LB
	ESP	Fase estacionária inicial (ESP, OD ₆₀₀ 2,0) em LB
	LSP	Fase estacionária tardia (LSP, OD ₆₀₀ 2,0 + 6h) em LB
	25°C	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3 a 25 C
	Choque NaCl	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois se adicionou NaCl a uma concentração final de 0,3 M e cultivadas por 10 min
	Choque por sais biliares	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois se adicionou bile a uma concentração final de 3% e cultivadas por 10 min
	Limitação de Fe ²⁺	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3, depois se adicionou 2,2'-dipiridil a uma concentração final de 0,2 mM e cultivadas por 10 min
	Choque anaeróbico	Crescimento em LB até OD ₆₀₀ 0,3 (50 ml), cultivadas em tubo de Falcon fechado de 50 ml e incubado sem agitação a 37°C por 30 min
	Crescimento anaeróbico	Crescimento estático em LB até OD ₆₀₀ 0,3 em um tubo Falcon de 50 ml completamente cheio e fechado
	Choque aeróbico	Crescimento estático em LB até OD ₆₀₀ 0,3 em um tubo Falcon de 50 ml completamente cheio e fechado e, em seguida, 15 min de crescimento aeróbico sob agitação a 250 rpm
	NonSPI2	Crescimento em meio PCN (pH 7,4, 25 µM Pi) para OD ₆₀₀ 0,3
	InSPI2	Crescimento em meio PCN (pH 5,8, 0,4 µM Pi) para OD ₆₀₀ 0,3
	Choque peróxido (InSPI2)	Crescimento em PCN (InSPI2) para OD ₆₀₀ 0,3, depois adição de H ₂ O ₂ à concentração final de 1 µM de H ₂ O ₂ por 12 min
Oxido nítrico (InSPI2)	Crescimento em meio PCN (InSPI2) para OD ₆₀₀ 0,3, depois adição de <i>Spermine</i> NONO até 250 µM por 20 min	
	Macrófagos	Crescimento dentro do ambiente intra-macrófag