

EDUARDO DE SOUZA ALVES

Análise do efeito de metabólitos da microbiota  
gastrointestinal na virulência de *Salmonella enterica*



**Monografia apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
2016

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Dr. Luis Caetano Martha Antunes e coorientação do Dr. Rafael José Marques Peixoto.**

## CIP - Catalogação na Publicação

A472a Alves, Eduardo de Souza  
Análise do efeito de metabólitos da microbiota gastrointestinal na virulência de Salmonella enterica / Eduardo de Souza Alves. -- Rio de Janeiro, 2016.  
46 f.

Orientador: Luis Caetano Martha Antunes.  
Coorientador: Rafael José Marques Peixoto.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. Salmonella. 2. microbiota. 3. sinalização. 4. hlaA. I. Antunes, Luis Caetano Martha , orient. II. Peixoto, Rafael José Marques, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Eduardo de Souza Alves**  
DRE: 113043903

BANCA EXAMINADORA: Profa. Regina Maria C. Pilotto Domingues (Presidente)  
Dra. Hilana Ceotto Vigoder  
Dr. Felipe Lopes Teixeira  
Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira (Suplente)

Título da Monografia: **“Análise do efeito de metabólitos da microbiota  
gastrointestinal na virulência de Salmonella enterica”**

Local: Sala de Seminários do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes /CCS/ UFRJ

Data e hora de início: 07 de dezembro de 2016 às 13:30h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,9 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 7 de dezembro de 2016.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	<u>Regina Maria C. Pilotto Domingues</u> Profa. Regina Maria C. Pilotto Domingues
<u>9,5</u>	<u>Hilana Ceotto Vigoder</u> Dra. Hilana Ceotto Vigoder
<u>10,0</u>	<u>Felipe Lopes Teixeira</u> Dr. Felipe Lopes Teixeira
<u>10,0</u>	<u>Rosana Barreto Rocha Ferreira</u> Profa. Rosana Barreto Rocha Ferreira
Aluno:	<u>Eduardo de Souza Alves</u> Eduardo de Souza Alves
Orientador:	<u>Luís Caetano Martha Antunes</u> Dr. Luís Caetano Martha Antunes
Co-orientador:	<u>Rafael José Marques Peixoto</u> Dr. Rafael José Marques Peixoto
Coordenador de TCC	<u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sr. Marcos e a D. Fada, que mesmo a oceanos de distância se fazem presente todos os dias da minha vida. Sigo minha caminhada no intuito de ser um motivo maior de orgulho para vocês. O amor de vocês me trouxe até aqui. Obrigado por tudo!

Aos meus irmãos, Vinícius Alves, Leonardo Alves e Fellipe Kenji. Por serem parte essencial da minha vida.

A minha namorada, Morgana Cerqueira. Por ser a menina mais incrível que conheço e me inspirar em ser alguém melhor dia após dia.

Aos meus grandes amigos e mentores, Rafael Peixoto e Alessandra Granato, por todos os ensinamentos e conselhos. Obrigado por serem quem vocês são para mim.

A professora Bernadete Ferreira, pelo carinho e atenção de sempre.

Ao meu orientador Caetano Antunes pela confiança, paciência e dedicação em minha formação.

A querida professora Regina Domingues, por carregar o sorriso mais sincero e pelo carinho especial durante todos esses anos.

Ao professor Leandro Lobo. Por todas as conversas, ensinamentos e cervejas.

A professora Eliane Ferreira, por todos ensinamentos e pela amizade construída nesses quatro anos.

Ao meu amigo Helver Dias. Grata surpresa dos anos de faculdade e amizade que levo para toda vida. Obrigado por tudo, meu querido!

Ao meu amigo Joaquim dos Santos, por todos os cafés e resenhas durante esses quatro anos.

Ao amigo e professor, Walter Oelemann, pessoa que me introduziu a ciência e um alguém que guardo com grande estima.

Aos amigos de Guelph, Mitch, Carlucci, Valeria, Phillip, Maverick, Michelle, Amaya e Jose. Por fazerem parte de alguns dos momentos mais marcantes da minha vida. Que esses momentos sejam eternizados em nossas memórias.

A University of Guelph, na pessoa de Emma Allen-Vercoe, pela oportunidade de vivenciar uma das épocas mais importantes da minha vida. “Go Gryphs Go!”

A todo o laboratório de Biologia de Anaeróbios pelos sorrisos e pelas lágrimas. Por todos os momentos que tive a oportunidade de dividir com vocês.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro. Minha casa e meu orgulho!

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

## RESUMO

EDUARDO DE SOUZA ALVES

### ANÁLISE DO EFEITO DE METABÓLITOS DA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL NA VIRULÊNCIA DE *SALMONELLA ENTERICA*

Orientador: Luis Caetano Martha Antunes

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A microbiota gastrointestinal caracteriza-se como um grande complexo de microrganismos, estimados em mais de 1.000 espécies, que exercem funções críticas na manutenção da saúde de seu hospedeiro. Nesse contexto heterogêneo, complexas interações ocorrem entre diferentes grupos microbianos e seu hospedeiro, afetando não só a relação entre estas duas partes mas também a resistência ou susceptibilidade à invasão por patógenos exógenos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a modulação da infecção por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium por metabólitos presentes na microbiota gastrointestinal. Através de estudos de sequenciamento de RNA, nosso grupo demonstrou anteriormente que a adição de um extrato de moléculas de baixo peso molecular de fezes humanas afetou a expressão de dezenas de genes de *Salmonella*. Interessantemente, genes envolvidos na invasão de células do hospedeiro encontraram-se entre os mais afetados. Através da caracterização do extrato fecal por meio de uma série de técnicas de purificação e análise molecular, pôde-se observar a presença de diversos compostos aromáticos nestas amostras. A partir do perfil observado, foram escolhidas algumas moléculas, e as mesmas foram obtidas de fontes comerciais e testadas quanto à sua capacidade de modular a expressão de genes de invasão de *Salmonella*. Uma destas moléculas, o ácido 3,4-dimetilbenzoico, demonstrou atividade significativa, reprimindo a expressão de genes de invasão de *Salmonella*, entre eles o gene *hilA*, principal regulador da Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* 1. Através de um ensaio de invasão de células hospedeiras, pôde-se constatar uma redução de 84% no potencial de invasão de *Salmonella* na presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico. Os resultados obtidos demonstraram que há uma forte modulação transcricional de um dos principais fatores de virulência deste microrganismo, e que tal modulação compromete o potencial de invasão em células hospedeiras. O presente trabalho representa um passo importante para o entendimento das variadas funções da microbiota intestinal e as interações envolvidas em seu ambiente natural.

**Palavras-chave:** *Salmonella*, microbiota, metabólitos, sinalização.

## ABSTRACT

EDUARDO DE SOUZA ALVES

### THE EFFECT OF HUMAN GASTROINTESTINAL METABOLITES ON *SALMONELLA ENTERICA* VIRULENCE

**Orientador: Luis Caetano Martha Antunes**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

The gastrointestinal microbiota is commonly described as an intricate complex of microorganisms, estimated to contain over 1000 species, and that has critical functions for the maintenance of host health. Current knowledge of the gastrointestinal microbiota and its relationship with the host suggests that complex interactions between different microbial species as well as between microbes and host cells occur in this environment. Such interactions have the ability to affect not just the relationship between the cells involved, but may also impinge on host resistance or susceptibility to invasion by exogenous pathogens. In order to better understand the interactions between the microbiota, pathogens and the host in the gastrointestinal tract, we studied the effect of metabolites from the gastrointestinal microbiota on the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Initially, the effect of a crude extract of human feces on *Salmonella* growth and gene expression was studied. This revealed that *Salmonella* readily responds to the presence of fecal small molecules; expression of genes involved in host cell invasion was highly affected. Through a characterization of this crude extract using standard purification methods coupled with mass spectrometry, we obtained active fractions that contained various aromatic compounds. Based on these small-molecule profiles, we then obtained some of the potential bioactive molecules from commercial sources and tested their ability to modulate invasion gene expression. One of these molecules, 3,4-dimethylbenzoic acid, showed significant activity, repressing the *Salmonella* virulence gene regulator *hilA*, the most important regulator of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1. A host cell invasion assay, using a tissue culture infection model, showed that the presence of 3,4-dimethylbenzoic acid caused a reduction in invasion of 84%. The present work deepens our previous knowledge of the roles of the human gut microbiota and provides a framework for the study of other small molecules involved in microbiota-pathogen interactions.

**Keywords: *Salmonella*, microbiota, small molecules, signaling**



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do Sistema de Secreção do Tipo III da SPI-1 de <i>Salmonella enterica</i> .....	8
Figura 2: Microscopia eletrônica da superfície de uma célula bacteriana com agulhas do SST-III .....	9
Figura 3: Organização genética e transcricional da Ilha de Patogenicidade I de <i>Salmonella enterica</i> .....	10
Figura 4: Estruturas das moléculas testadas .....	14
Figura 5: Cinética de crescimento das cepas de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium SL1344 e ST010 .....	20
Figura 6: Cinética de crescimento da cepa ST010 na presença e ausência das moléculas testadas .....	21
Figura 7: Análise da expressão de <i>hilA</i> na presença e ausência das moléculas selecionadas para o presente estudo (1) .....	22
Figura 8: Análise da expressão de <i>hilA</i> na presença e ausência das moléculas selecionadas no presente estudo (2).....	22
Figura 9: Expressão do gene <i>hilA</i> da cepa SL1344 na presença e ausência das diferentes moléculas.....	23
Figura 10: porcentagem de inibição da expressão de <i>hilA</i> -GFP na presença da ácido 3,4-dimetilbenzoico .....	24
Figura 11: Expressão relativa do gene <i>hilA</i> na presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico .....	25
Figura 12: Expressão relativa de genes transcritos na SPI-1 .....	26
Figura 13: Ação da presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico no potencial de invasão de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium em células HeLa .....	27

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1: Moléculas utilizadas neste estudo.....	13
Tabela 2: Ciclo utilizado na PCR convencional.....	16
Tabela 3: Ciclo utilizado para a síntese do cDNA.....	16
Tabela 4: Ciclo utilizado para a realização do qPCR.....	17
Tabela 5: Relação dos iniciadores utilizados.....	18

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AI</b>	Auto indutores
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNase</b>	Desoxirribonuclease
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>g</b>	<i>Gravitational force</i>
<b>gDNA</b>	DNA genômico
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monopotássico
<b>LB</b>	Meio Luria Bertani
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaHPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT qPCR</b>	PCR quantitativo em tempo real
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SPI</b>	<i>Salmonella pathogenicity island</i>
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>µg</b>	Micrograma

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iv
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A microbiota humana .....	1
1.2 Sinalização química.....	2
1.3 O metaboloma do trato gastrointestinal.....	3
1.4 <i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium.....	5
1.5 A virulência de <i>Salmonella</i> .....	7
2. JUSTIFICATIVA .....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral:.....	12
3.2 Objetivos específicos:.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1 Cepas utilizadas .....	13
4.2 Metabólitos utilizados .....	13
4.3 Monitoramento do crescimento bacteriano e expressão de <i>hilA</i> através de citometria de fluxo .....	14
4.4 A atividade do ácido 3,4-dimetilbenzoico.....	15
4.5 PCR quantitativo em tempo real (RT qPCR) .....	15
4.5.1 Extração de RNA.....	15
4.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	16
4.5.3 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	16
4.5.4 Iniciadores utilizados.....	17
4.6 Análise dos genes de SPI-1 .....	17
4.7 Teste de invasão de células hospedeiras.....	19
4.8 Análises estatísticas.....	19
5. RESULTADOS .....	20
5.1 Monitoramento do crescimento bacteriano.....	20
5.2 Análise da expressão de <i>hilA</i> através de citometria de fluxo.....	21
5.3 Análise da expressão de <i>hilA</i> através de qPCR.....	23
5.4 A atividade do ácido 3,4-dimetilbenzoico.....	23
5.5 Modulação do gene <i>hilA</i> .....	24
5.6 Teste de invasão em células hospedeiras.....	26
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÕES.....	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A microbiota humana

O corpo humano é colonizado por uma complexa comunidade de microrganismos, denominada microflora, microbiota ou, mais recentemente, microbioma. Acredita-se que toda superfície do corpo humano exposta ao meio externo detém uma microbiota característica, apresentando sua diversidade constitucional e funcional (Antunes *et al.*, 2011).

Apesar de algumas controvérsias, é aceito que o desenvolvimento da microbiota no organismo humano tem início imediatamente após o nascimento, e sabe-se que o tipo de parto influencia diretamente a microbiota formada nos primeiros meses de vida do bebê, que se estabiliza através dos anos, atingindo um *core* de microrganismos comuns aos adultos saudáveis. A variabilidade microbiana ao longo da vida pode ser influenciada por diversos fatores, como dieta, tratamento com antimicrobianos, idade e patologias. Recém nascidos através de parto normal apresentam microbiota semelhante à encontrada na vagina da mãe, adquirida através da passagem pelo canal vaginal no momento do parto. Já os recém natos por cesariana apresentam microbiota similar à encontrada na pele da mãe e dos profissionais de saúde envolvidos no parto. No contexto da microbiota gastrointestinal, a distinção dos principais grupos microbianos encontrados é explicada, principalmente, pela dieta do bebê. Aqueles alimentados através da amamentação materna apresentam, majoritariamente, bactérias do gênero *Bifidobacterium*. Em contrapartida, aqueles alimentados através de fórmula infantil apresentam uma maior diversidade de gêneros (Bezirtzoglou, Tsiotsias e Welling, 2011). Ao atingir idade adulta, a microbiota gastrointestinal tende a se estabilizar em uma constituição comum à maioria dos adultos saudáveis, predominantemente composta por dois filos: Bacteroidetes e Firmicutes (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2009).

Atualmente, a microbiota gastrointestinal tem sido um dos alvos mais abordados em linhas de pesquisa sobre a dinâmica de interações micróbio-hospedeiro. Estima-se que este conjunto microbiano possua cerca de 1000 espécies bacterianas, com um potencial de expressão gênica 100 vezes maior do que o encontrado no genoma humano (Turnbaugh *et al.*, 2006). Através de estudos prévios atestou-se a influência dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal (TGI) em diversos processos metabólicos, como a conversão energética através da degradação de fibras alimentares, ativação da assimilação de nutrientes e síntese de vitaminas, por exemplo (Tremaroli e Backhed 2012). Além do seu papel na alimentação, a

microbiota intestinal desempenha uma série de funções extremamente importantes para a saúde humana (Guinane e Cotter, 2013), não só no contexto metabólico, mas também auxiliando no desenvolvimento do sistema imune e na proteção frente a possíveis patógenos invasores, entre outras (Sekirov *et al.*, 2010). Embora estas diversas funções da microbiota gastrointestinal estejam estabelecidas, ainda não é possível elucidar a maioria dos mecanismos envolvidos nestas funções devido à grande complexidade do consórcio microbiano envolvido e às constantes interações microrganismo-hospedeiro (Antunes *et al.*, 2014). Neste ambiente heterogêneo ocorrem inúmeras interações entre os diferentes grupos microbianos presentes e seu hospedeiro, afetando não só a relação entre ambas as partes mas também a resistência ou susceptibilidade à invasão por patógenos exógenos (Willing *et al.*, 2011). Assim, estudos que determinem como essas interações celulares modulam os papéis da microbiota na manutenção da saúde humana ainda são necessários para uma maior compreensão desta comunidade microbiana.

## 1.2 Sinalização química

A habilidade de se comunicar é um fator essencial para o estabelecimento e manutenção das relações entre a maioria dos organismos vivos. Através de estudos ao longo das últimas décadas, pôde-se comprovar que bactérias são capazes de se comunicar, e que a utilização de tal recurso permite uma interação mais eficiente (Peixoto *et al.* 2013), contribuindo para uma melhor adaptação do microrganismo ao meio ambiente que se encontra. Alguns dos mecanismos de comunicação entre bactérias ocorrem através da produção de pequenas moléculas que agem como sinais (Antunes *et al.*, 2010a). Tal mecanismo foi descoberto no final da década de 60 e início da década de 70, quando pesquisadores perceberam que certas características microbianas, como a competência de *Streptococcus pneumoniae* e a bioluminescência de *Vibrio fischeri* dependiam da densidade celular para serem expressas (Fuqua, Parsek e Greenberg, 2001; Fuqua e Greenberg, 2002; Bassler e Losick, 2006; Smith *et al.*, 2006). Nestes estudos, os autores puderam observar que no início do crescimento bacteriano estas propriedades não eram ativadas. Entretanto, após alcançar uma certa fase de crescimento, as culturas começavam a expressar tais características, de maneira mais rápida do que o seu crescimento propriamente dito. Interessantemente, a adição de sobrenadantes de culturas prévias, no início da cultivo dessas mesmas bactérias eliminava o atraso na expressão destas propriedades, indicando que havia algo produzido pela cultura que se acumulava no meio e ativava a expressão da competência e

bioluminescência. Devido a essa aparente necessidade do acúmulo de um número mínimo de células para que certas propriedades fossem expressas, na década de 90 esse fenômeno foi denominado *quorum sensing* (Fuqua, Winans e Greenberg, 1994). Atualmente, é amplamente aceito que o *quorum sensing* é um mecanismo de sinalização química e regulação gênica dependente de densidade celular, onde pequenas moléculas, denominadas auto indutores (AI), são produzidas, difundem-se ou são transportadas através da membrana plasmática e se acumulam no meio externo. Após atingirem concentrações críticas, estas moléculas são capazes de se ligar e ativar receptores no interior ou superfície das células bacterianas, modulando a expressão gênica do microrganismo para uma melhor adaptação ao meio. Tais moléculas desempenham funções homólogas às dos hormônios, e apresentam importantes funções na manutenção da homeostase fisiológica, permitindo a resposta e adaptação à estímulos externos (Antunes, Davies e Finlay, 2011).

### **1.3 O metaboloma do trato gastrointestinal.**

A diversidade microbiana e genética, fundamentada pelo grande potencial de expressão gênica encontrada no trato gastrointestinal, abrem a possibilidade quase óbvia, de que haja também uma grande diversidade química neste ambiente. Sendo grande parte dos membros da microbiota metabolicamente ativos, estes estão constantemente produzindo e excretando pequenas moléculas. Estas moléculas formam um arcabouço químico que pode então exercer uma série de funções no ambiente do trato gastrointestinal. Ao conjunto de moléculas pequenas presentes em um determinado ambiente damos o nome de metaboloma (Kell, 2004; Han *et al.*, 2008). Até muito recentemente, a maior parte do metaboloma intestinal vinha sendo completamente negligenciada, devido à crença de que as moléculas ali presentes representariam apenas produtos de excreção do metabolismo humano, sem grande importância biológica. Entretanto, em 2011, Antunes e colaboradores, através de estudos do metaboloma intestinal usando técnicas de espectrometria de massas de alta vazão, demonstraram que é possível encontrar mais de 2000 metabólitos no trato gastrointestinal. Das moléculas encontradas, muitas possuem funções biológicas importantes, como por exemplo os hormônios esteroides e eicosanoides, amplamente detectados no metaboloma intestinal neste estudo (Antunes *et al.*, 2011). Assim como a microbiota propriamente dita, imagina-se que o metaboloma intestinal também possa ser modulado, respondendo a estímulos externos, como a alimentação, uso de medicamentos e qualquer outro *input* que

resulte em variações da composição da flora intestinal, influenciando na heterogeneidade encontrada neste sítio. Desta forma, Antunes e colaboradores demonstraram que o tratamento com uma alta dose de antibiótico alterou significativamente os níveis de mais de 87% das moléculas presente no metaboloma intestinal, mostrando de fato que tal arcabouço químico responde à estímulos externos, e que tais respostas podem ter papéis fundamentais em processos de saúde e doença (Antunes *et al.* 2011).

No contexto de alta heterogeneidade microbiana, genética e química encontrada na microbiota gastrointestinal, sugere-se que existam diversas oportunidades para a ocorrência de importantes interações neste sítio, sejam estas interações microrganismo-microrganismo, como também microrganismo-hospedeiro. É sabido que microrganismos comensais da microbiota são capazes de interagir entre si e com hospedeiros através de fenômenos de sinalização química (Antunes, Davies e Finlay, 2011), fenômenos estes recorrentes na grande maioria dos organismos vivos, incluindo organismos superiores e inferiores (Starling, 1905). No contexto microbiano, apesar de muitos mecanismos de *quorum sensing* terem sido descritos na literatura, até o presente momento são escassos os estudos demonstrando a ocorrência de sinalização química entre a microbiota e patógenos.

Considerando tal fato, Antunes e colaboradores demonstraram recentemente que a maioria das moléculas presentes no metaboloma intestinal é atualmente desconhecida (Antunes *et al.*, 2011). Esta observação surgiu como provocação para a hipótese de que muitas dessas pequenas moléculas encontradas na microbiota intestinal devem exercer alguma função importante para a manutenção da homeostase do sistema, e que tais funções são, no momento, completamente ignoradas. Assim, Antunes e colaboradores realizaram um estudo para investigar o efeito do metaboloma intestinal na expressão gênica de um patógeno entérico, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Utilizando o sequenciamento de RNA mensageiro de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium crescida na ausência e presença de um extrato de moléculas pequenas de fezes humanas, os autores demonstraram que dezenas de genes bacterianos apresentaram expressão diferenciada na presença do metaboloma intestinal (Antunes *et al.*, 2014). Dentre os genes diferencialmente regulados podemos citar genes relacionados ao metabolismo, motilidade e quimiotaxia, produção de fímbrias e invasão de células hospedeiras, entre outros, totalizando mais de 100 genes alterados, sendo muitos deles intimamente relacionados à virulência desse microrganismo.

Além disso, através de análises posteriores, foram obtidas diversas frações do extrato



fecal, através da utilização de filtros com diferentes pontos de corte de peso molecular, cartuchos de resinas hidrofóbicas e cromatografia líquida de alta performance. Tais frações foram testadas quanto à sua capacidade de modular a expressão gênica de *Salmonella*, e frações biologicamente ativas foram analisadas por espectrometria de massas, gerando uma lista de potenciais moléculas com atividade frente à *S. enterica* sorovar Typhimurium, como descrito em mais detalhes no decorrer deste trabalho. Tais achados ratificam a teoria de que pequenas moléculas encontradas no microbioma humano de fato possuem funções biológicas importantes e que, até então, eram ignoradas ou desconhecidas.

#### 1.4 *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium

Os membros do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não capsulados, de grande maioria móvel, não produtores de esporos, pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. O gênero compreende duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a espécie *S. enterica* subdividida em mais de 2000 sorovares, tendo o sorovar Typhimurium como um dos mais estudados e mais comumente associados a quadros de gastroenterite, passível de causar infecções tanto em humanos como em outros mamíferos (McClelland *et al.*, 2001). Estirpes de *S. enterica* são responsáveis por ocasionar o maior número de infecções bacterianas de origem alimentar. No entanto, a contaminação também pode ocorrer através da pele lesionada, trato respiratório e pela conjuntiva (Schwartz, 1999).

As manifestações dos quadros patológicos associados a *Salmonella spp.* divergem desde uma infecção gastrointestinal branda até uma infecção sistêmica, variando de acordo com o sorovar envolvido, estado imunológico do hospedeiro, fatores de virulência expressos pelo agente e inóculo microbiano (Ochoa e Rodríguez, 2005). Ao alcançarem o ambiente gastrointestinal, há a adesão e proliferação no intestino. A invasão da mucosa intestinal ocorre através de transporte pelo epitélio intacto, através de mecanismos de virulência que induzem sua fagocitose bacteriana por células não fagocíticas (Goosney, Knoechel e Finlay, 1999). Na mucosa intestinal, diversos tipos celulares podem ser encontrados, entre eles as células de Paneth, células M, enterócitos absorptivos e células da cripta. Entre os tipos celulares citados, de acordo com Asten e colaboradores (2005), as células M agrupadas sobre a placa de Peyer e os enterócitos absorptivos são consideradas as principais portas de entrada de *Salmonella spp.*. A interação patógeno-hospedeiro desencadeia a ativação de sinalizadores celulares, seja por

componentes bacterianos ou por estimulação de fatores ativadores do próprio hospedeiro. A presença de tais ativadores pode levar a alterações na superfície da célula hospedeira através da modificação dos receptores celulares. *Salmonella spp.* é capaz de responder a tais modificações por meio da modulação do tipo de adesina a ser apresentada (Darwin e Miller, 1999). O aparato de adesinas de *Salmonella* encontra-se de acordo com os achados de Ochoa e Rodríguez, que afirmam uma maior predominância de fímbrias, *pili*, flagelo, lipopolissacarídeo (LPS) e cápsula em bactérias Gram negativas (Ochoa e Rodríguez, 2005). Além disso, a interação de *Salmonella spp.* com as células do hospedeiro desencadeia a produção de moléculas sinalizadoras pelas células epiteliais, que estimulam a inflamação e migração de leucócitos. A migração destes leucócitos provoca a inibição da absorção de  $\text{Na}^+$ , e o aumento da secreção de  $\text{Cl}^-$  devido à produção de prostaglandinas, contribuindo para o quadro mais comumente associado à gastroenterite, a diarreia. Uma peculiaridade do sorovar Typhimurium é a capacidade de atingir o fígado e baço sem a colonização prévia do intestino, ou mesmo sem provocar a invasão de células epiteliais. Tal competência se dá devido a uma afinidade por fagócitos que expressam uma integrina denominada CD18, que carrega as células bacterianas, levando-as do lúmen intestinal para a circulação, baço e fígado logo após sua internalização pelo fagócito (Vázquez *et al.*, 1999).

Diversos fatores de virulência estão associados aos mecanismos de patogenicidade de *Salmonella spp.*. A maioria destes fatores responde de acordo com a capacidade de modular a expressão de seus genes de virulência frente a condições adversas como o pH estomacal, aumento de temperatura, baixa tensão de oxigênio, alta osmolaridade, ação da bile, peristaltismo, as lisozimas, as lactoferrinas e a microbiota local. Entre tais mecanismos, os mais importantes estão relacionados às adesinas, às invasinas, e aos fatores responsáveis pela inibição das defesas do hospedeiros. Tais fatores são essenciais ao microrganismo, pois através destes se permite a ocorrência de processos vitais para a manutenção do microrganismo no organismo hospedeiro por meio de mecanismos de invasão, colonização, sobrevivência e multiplicação. Uma das etapas cruciais para a patogênese de *S. enterica* é a invasão do tecido hospedeiro. *S. enterica* é capaz de invadir as células do hospedeiro através de um mecanismo conhecido como “*trigger*”, levando a produção de sinais que são enviados às células hospedeiras, acarretando alterações do citoesqueleto das mesmas e permitindo a internalização da bactéria para alguma vesícula endocítica (Ochoa e Rodríguez, 2005).

## 1.5 A virulência de *Salmonella*

Acredita-se que evolução na patogenicidade da família *Enterobacteriaceae* está altamente relacionada à presença de regiões colineares intercaladas na composição de seu genoma. Estas regiões, denominadas como “ilhas”, codificam funcionalidades patogênicas e podem ser específicas em determinadas espécies (McClelland *et al.*, 2011). A presença destes elaborados conjuntos de genes favorece sua adaptação a diferentes hospedeiros e seus sistemas de defesas, fundamentando a diversidade de hospedeiros susceptíveis encontrados para o gênero (Rhen e Dorman, 2005).

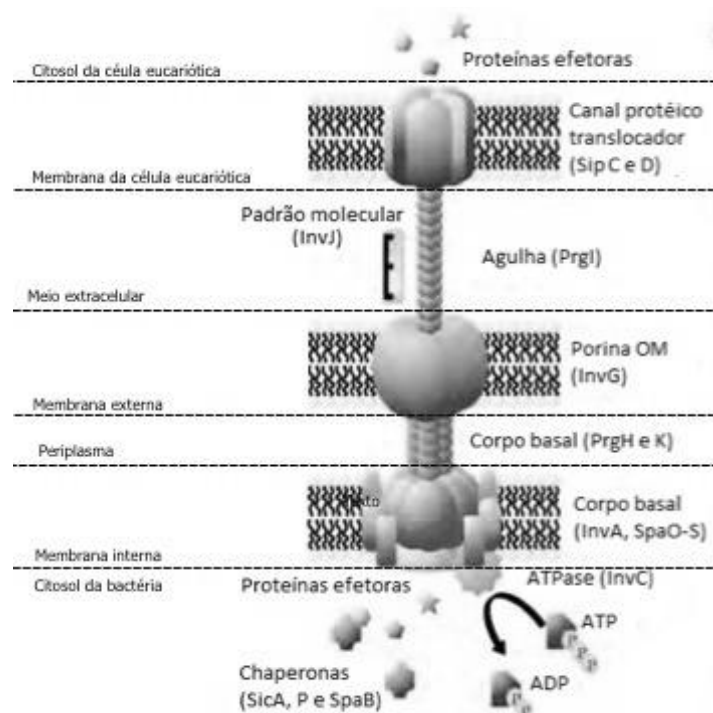
As Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (*Salmonella Pathogenicity Island*, SPI) compreendem grandes regiões do cromossomo responsáveis principalmente por codificar diversos fatores de virulência. As SPIs, contém em sua grande maioria um conteúdo guanidina e citosina (G+C) abaixo do restante do cromossoma (52%), variando entre 37 e 47%, e frequentemente estão localizadas adjacentes a genes que codificam RNA transportador (Marcus *et al.*, 2000; Van Asten e Van Dijik, 2005; Gal-Mor e Finlay, 2006; Vieira, 2009). A proximidade aos genes de tRNA é justificada pelo fato de que estes genes ancoram pontos de inserção de DNA exógeno adquiridos através de transferências horizontais, por exemplo.

A eficiência na capacidade invasiva de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium está codificada por genes localizados na SPI-1. A SPI-1 está presente no cromossomo 63 do cromossomo de *Salmonella*, é composta por aproximadamente 40 genes e tem um conteúdo G+C de cerca de 44.97%. Diferentemente da maioria das SPIs, a SPI-1 não está associada à genes de tRNA (Vieira, 2009), e apresenta um caráter conservado, exercendo papel fundamental na virulência de *Salmonella spp.* (Que, Wu e Huang, 2012). A SPI-1 atua na invasão celular devido à codificação de um Sistema de Secreção do Tipo III (SST-III), composto por reguladores, proteínas efetoras e também chaperonas, e que tem a função de injetar proteínas bacterianas nas células hospedeiras. Tais proteínas têm como papel a subversão do citoesqueleto celular, gerando a formação de “ondas”, ou *ruffles* na membrana, que englobam as bactérias associadas, permitindo a fagocitose de *S. enterica* por células hospedeiras não fagocíticas (Bajaj, Whang e Lee, 1995; Rychlik *et al.*, 2009).

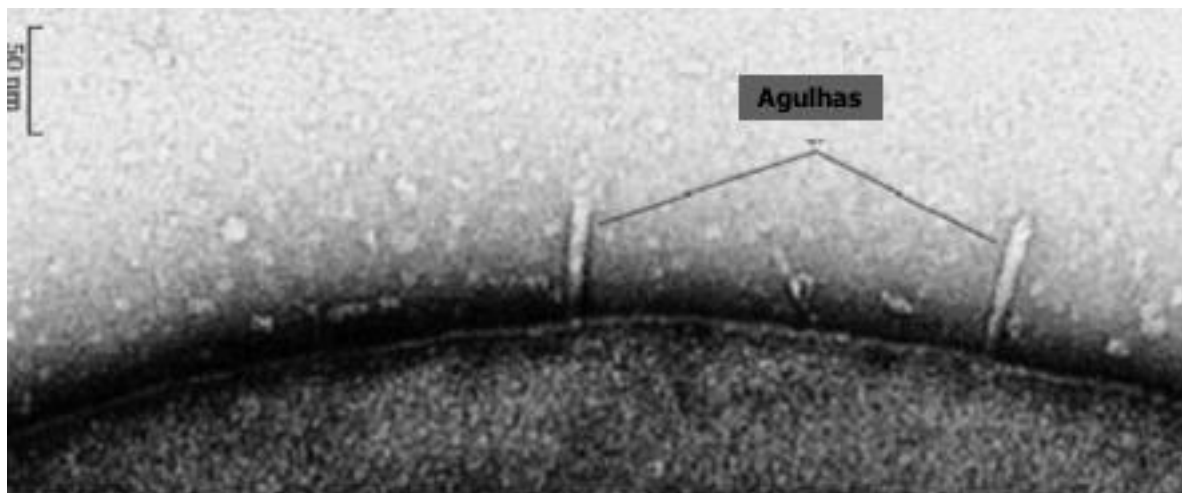
O SST-III (Figura 1 e 2) constitui um mecanismo de virulência comum em diversas bactérias Gram-negativas, e possibilita a translocação de proteínas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira. Alguns dos genes relacionados ao SST-III são *inv*, *spa* e *prg*, sendo os

principais responsáveis pela síntese de proteínas que compõem a estrutura deste sistema de secreção (Marcus *et al.*, 2000; Galán, 2001; Schmidt e Hensel, 2004; Ochoa e Rodríguez, 2005). O operon *inv* (*invasibility*) é constituído por sete genes, *invABCDEFG*. O gene *invA* desempenha função importante na invasão de células epiteliais. Galán e colaboradores demonstraram que sorotipos de *S. enterica* que não possuem o gene *invA* são incapazes de expressar os genes *invBC*. A incapacidade de expressar tais genes impossibilita estes sorotipos de invadir as células de mamíferos (Porter e Curtiss, 1997).

Ginocchio e colaboradores (1994) observaram que mutações nos genes *invG* e *invC* resultam na falha na agregação do SST-III à célula alvo, levando à incapacidade de penetração nas células epiteliais cultivadas *in vitro*. Cepas mutantes para os genes *invA* e *invE* são bem sucedidas na agregação, porém falham ao recolher ou desprender o SST-III no momento da internalização da bactéria em células epiteliais. O gene *invA* parece ser bastante conservado em todos os sorovares de *S. enterica*, sendo um dos principais genes utilizados para a detecção do SST-III, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Wang *et al.*, 2009). O gene *invH* codifica uma lipoproteína extramembranar que exerce papel importante na patogenicidade de *S. enterica*, por sua ação na lise de macrófagos, secreção de proteínas Sip e localização de partes estruturais do SST-III (Dehghani *et al.*, 2014).



**Figura 1:** Esquema representativo do Sistema de Secreção do Tipo III da SPI-1 de *S. enterica*. Fonte: Adaptado de Wisner *et al.*, 2012.



**Figura 2:** Microscopia eletrônica da superfície de uma célula bacteriana com agulhas do SST-III. Fonte: Adaptado de Troisfontaines e Cornelis, 2005.

A SPI-1 contém também os genes *sptP*, *sipA* e *sipB*, que são referentes às proteínas efetoras SptP, SipA e SipB, respectivamente. SptP e SipA têm suas funções relacionadas ao rearranjo da actina presente na parede da célula hospedeira alvo, levando à formação de poros e permitindo a translocação das proteínas (Kaniga *et al.*, 1996; Fu e Galán, 1998; Zhou *et al.*, 1999; Marcus *et al.*, 2000; Garai, Gnanadhas e Chakravorty, 2012). Já SipB é responsável pela indução de apoptose em macrófagos pela ativação da caspase-1 (Chen *et al.*, 1996; Hersh *et al.*, 1999; Marcus *et al.*, 2000; Schmidt e Hensel, 2004).

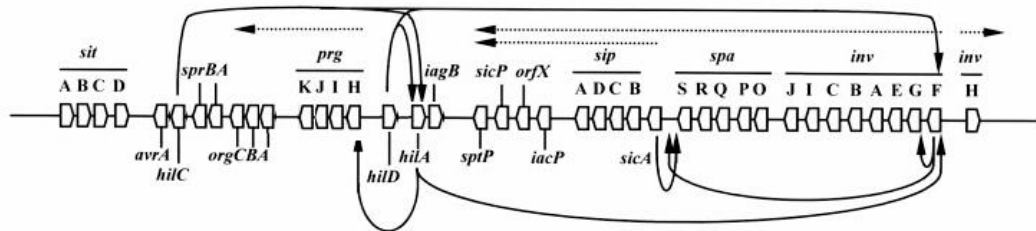
Em 2010, Saini e Rao demonstraram que *sprB*, um dos genes presentes na SPI-1 também contemplado neste trabalho, atua como regulador da SPI-4 de *Salmonella spp.* Embora seu papel não esteja totalmente elucidado, acredita-se que a principal função exercida pela SPI-4 é a secreção de citocinas e a sobrevivência da célula bacteriana no interior do macrófago (Marcus *et al.*, 2000).

Por ser uma ferramenta fundamental para a patogênese de *Salmonella*, a expressão de SPI-1 é criteriosamente regulada para atender as necessidades da bactéria. Tal regulação ocorre em resposta frente a diversos estímulos do meio ambiente, como o estágio de crescimento da bactéria, osmolaridade e oxigênio disponível, por exemplo, além de ter sua regulação principalmente mediada através seus reguladores HilC, HilD, HilA e InvF (Schmidt e Hensel, 2004).

O gene *hilA* (*hyper invasive locus*), descrito pela primeira vez em 1995 por Bajaj e

colaboradores, é o principal regulador de SPI-1 de *S. enterica* sorovar Typhimurium. Possui uma alta similaridade com os domínios ligantes da família de ativadores transcricionais OmpR-ToxR, os quais estão sabidamente associados à regulação da expressão de genes frente a diferentes condições fisiológicas do sítio de infecção (Bajaj, Hwang e Lee, 1995 apud Albright *et al.*, 1989; Stock *et al.*, 1989). HilA apresenta 56% de similaridade e 32% de identidade à OmpR/ToxR, em uma sequência de 87 aminoácidos analisados (Bajaj, Hwang e Lee, 1995).

A regulação de SPI-1 envolve uma cascata de ativação transcricional regulada por HilC, HilD, HilA e InvF, onde HilA apresenta papel fundamental para a expressão dos genes de SPI-1 (Figura 3). HilD e HilC ligam-se à sequência de DNA na região *upstream* ao promotor de *hilA*, removendo seu repressor deste sítio e permitindo sua expressão. Posteriormente, HilA liga-se aos sítios de início de transcrição, primeiramente de *invF* e *prgH*, e posteriormente de demais genes, resultando na expressão de genes que codificam componentes do SST-III (Schmidt e Hensel, 2004).



**Figura 3:** Organização genética e transcricional da Ilha de Patogenicidade I de *Salmonella enterica*. As caixas brancas representam ORFs (*open reading frames*). As setas contínuas indicam os sítios de ação dos ativadores transcricionais, e as setas pontilhadas indicam os transcritos. É possível observar a ação da cascata de ativação de *hilA* através da regulação por *hilC* e *hilD*. Observa-se também a ação de *hilA* na regulação de *inv*, *spa*, *sip* e *prg*.

Fonte: Adaptado de Pizarro-Cerdá e Tedin, 2001.

## 2. JUSTIFICATIVA

O complexo microbiano que caracteriza a microbiota gastrointestinal desperta grande interesse no melhor entendimento de sua dinâmica de manutenção, bem como as interações ocorridas entre os microrganismos e seus hospedeiros. Devido à necessidade de entendimento de tais interações, assim como à recente apreciação da diversidade química presente na microbiota do trato gastrointestinal, o presente estudo visa uma melhor elucidação dos fenômenos ocorridos na interface microbiota-hospedeiro frente a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, um patógeno invasor altamente conhecido. O trabalho tem como foco principal um melhor entendimento das funcionalidades de metabólitos presentes na microbiota gastrointestinal que possam contribuir para a homeostase deste ambiente.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar a modulação da virulência de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium por metabólitos produzidos pela microbiota no metaboloma gastrointestinal.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Investigar o possível efeito de metabólitos produzidos pela microbiota intestinal na expressão do gene regulador da SPI-1, *hilA*;
- Investigar o efeito de metabólitos que tenham atividade biológica contra *hilA* em outros genes da SPI-1;
- Descrever a atividade das moléculas que apresentarem atividade biológica significativa;
- Investigar o efeito destas moléculas no processo de infecção de células hospedeiras por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Cepas utilizadas

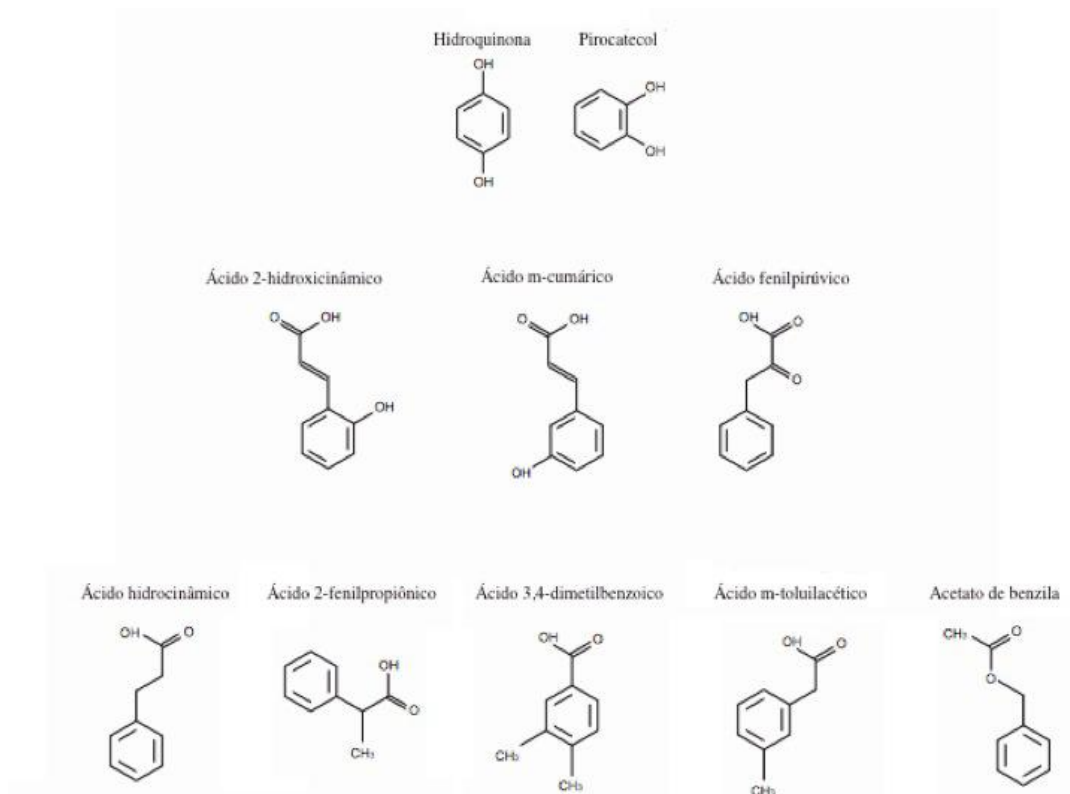
Para a realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real visando o monitoramento da expressão dos genes alvo, foi utilizada a cepa selvagem SL1344 de *S. enterica* serovar Typhimurium. Com a finalidade de se monitorar a expressão de *hilA* através de um método adicional, utilizou-se uma cepa repórter de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (SL1344) contendo o gene da proteína verde fluorescente (GFP) fusionada ao promotor do gene *hilA* (ST010), conforme previamente descrito (Antunes *et al.*, 2014).

### 4.2. Metabólitos utilizados

Para o presente estudo foram selecionadas 10 moléculas encontradas na microbiota gastrointestinal e que estão disponíveis para compra através de fontes comerciais (Tabela 1). A escolha das moléculas para teste se deu através de estudos prévios do grupo (Antunes *et al.*, 2014), onde frações biologicamente ativas de um extrato fecal foram caracterizadas por espectrometria de massas, gerando uma lista de possíveis identidades para as moléculas bioativas. Estas análises revelaram a presença de diversos compostos aromáticos, de estrutura e tamanho semelhantes (Figura 4). Todas as moléculas foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), e apresentam pureza igual ou maior que 95%.

**Tabela 1** – Moléculas utilizadas, com sua respectiva fórmula, peso molecular e grau de pureza.

MOLÉCULA	FÓRMULA	MASSA MOLECULAR (g/mol)	GRAU DE PUREZA
Hidroquinona	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,4-(OH) <sub>2</sub>	110.11	≥ 99%
Pirocatecol	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -1,2-(OH) <sub>2</sub>	110.11	≥ 99%
Ácido 2-hidroxicinâmico	HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH=CHCO <sub>2</sub> H	164.16	97%
Ácido hidrocinâmico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	150.17	99%
Ácido 3,4-dimetilbenzoico	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	150.17	98%
Ácido fenilpirúvico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> COCOOH	164.16	98%
Ácido m-toluilacético	CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	150.17	99%
Ácido m-cumárico	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164.16	95%
Acetato de benzila	CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	150.17	≥ 99%
Ácido fenilpropionico	CH <sub>3</sub> CH(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )CO <sub>2</sub> H	150.17	97%



**Figura 4:** Estruturas das moléculas testadas. Todas as moléculas apresentam anel fenólico, característica de compostos aromáticos.

### 4.3. Monitoramento do crescimento bacteriano e expressão de *hilA* através de citometria de fluxo

Com a finalidade de atestar o comportamento semelhante na cinética de crescimento de ambas as cepas, realizou-se o monitoramento durante uma curva de crescimento através da leitura por densidade óptica. Para tal procedimento, a partir de uma cultura *overnight*, as cepas SL1344 e ST010 foram inoculadas, em triplicatas, em meio líquido Luria Bertani (LB) - pH 7.4, em uma diluição 1:200, incubadas em aerobiose, sob agitação (125rpm) a 37 °C. As leituras da densidade óptica (DO 600nm) foram realizadas em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8h após inóculo.

No intuito de se avaliar uma possível atividade das moléculas testadas no crescimento da cultura bacteriana, assim como determinar a expressão de *hilA* através do monitoramento da fluorescência emitida pela cepa repórter (ST010), a mesma foi cultivada em meio líquido LB - pH 7.4, *overnight*, em aerobiose, sob agitação (125 rpm), a 37 °C. Em seguida, a cultura bacteriana foi inoculada na concentração de 1:200 em meio líquido LB - pH 7.4, em duplicata, na presença ou ausência das moléculas a serem testadas. Os testes iniciais foram realizados com a adição das referidas moléculas na concentração de 100 µM, diluídas em

dimetilsulfóxido (DMSO). O controle negativo foi realizado com a adição de DMSO ao meio líquido LB. As culturas foram então incubadas a 37°C, em aerobiose e sob agitação (125 rpm). Durante o crescimento bacteriano, realizou-se a leitura da densidade óptica (DO 600 nm) periodicamente, e foram retiradas alíquotas da cultura a cada duas horas, diluídas 1:10 e realizadas as leituras através de citometria de fluxo, no canal FL1 de um citômetro Beckman Coulter MoFlo Legacy (Beckman, Indianápolis, EUA). As leituras de densidade óptica foram realizadas nos períodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 e 24h após o inóculo inicial e as leituras através de citometria de fluxo, nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12h após o inóculo inicial.

#### **4.4. A atividade do ácido 3,4-dimetilbenzoico**

No intuito de se verificar a atividade observada pela presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico no meio de cultura, foram realizadas curvas de crescimento da cepa ST010 com diferentes concentrações do referido ácido em meio líquido LB – pH 7.4, sendo as concentrações utilizadas as de: 1, 10, 25, 50, 100 e 250 µM. As incubações foram feitas a 37°C, em aerobiose e sob agitação, sendo realizadas as leituras da DO (600 nm) nos períodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 e 24h após o inóculo.

#### **4.5. PCR quantitativo em tempo real (RT qPCR)**

##### **4.5.1. Extração de RNA**

Visando a obtenção do mRNA para a síntese do DNA complementar (cDNA) e análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real, foi realizada a extração de RNA de 1 mL das culturas da cepa selvagem SL1344, em triplicata, após cultivo de 4 horas a 37 °C, em aerobiose e sob agitação (125 rpm), na presença das moléculas de estudo. O volume de 1 mL de cultura teve seu RNA estabilizado com a utilização do reagente *RNA Protect Bacteria Reagent* (Qiagen, Hilden, Alemanha), na razão de 2:1 v/v (2 volumes de *RNA Protect Bacteria Reagent* para cada volume de cultura bacteriana utilizado) e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após o tratamento com o *RNA Protect Bacteria Reagent*, as células foram centrifugadas e a extração de RNA por método de coluna de afinidade, foi realizada utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) com tratamento adicional com a *RNase-Free DNase* (Qiagen), visando a remoção de qualquer DNA genômico (gDNA)

residual através de sucessivas aplicações da DNase à coluna. O RNA extraído foi quantificado com auxílio do aparelho NanoVue (GE HealthCare, Little Chalfont, Reino Unido).

#### 4.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

No intuito de verificar a pureza do RNA extraído, foram realizadas diversas PCRs (Tabela 2) utilizando como molde 100ng dos produtos das extrações de RNA. A não amplificação de fragmentos, exceto do controle (1ng de DNA de *S. enterica* serovar Typhimurium), constatou que a utilização das amostras de RNA purificadas não apresentavam DNA genômico residual detectável pela técnica de PCR, mesmo quando utilizadas 100X mais concentradas do que o controle. Para a realização desta PCR, foi utilizada a *GoTaq Hot Start Polymerase* (PROMEGA, Wisconsin, EUA) segundo as recomendações do fabricante.

**Tabela 2** : Ciclo utilizado na PCR convencional realizada para verificação da pureza do RNA.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
<b>Ativação da HotStarTaq DNA Polymerase</b>	94°C	5 min	1x
<b>Desnaturação</b>	94°C	30 seg	35x
<b>Anelamento</b>	65°C	45 seg	35x
<b>Extensão</b>	72°C	45 seg	35x
<b>Extensão final</b>	72°C	10 min	1x

#### 4.5.3. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Com o objetivo de possibilitar a análise da modulação da expressão gênica dos genes alvos através da técnica de PCR quantitativo em tempo real, foi utilizado 1 µg do RNA extraído para a realização da síntese do cDNA (Tabela 3), através do *Quantitect Reverse Transcription Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

**Tabela 3**: Ciclo utilizado para a síntese do cDNA.

Etapa	Temperatura	Tempo
<b>Ativação da Quantiscript® Reverse Transcriptase</b>	42°C	2 min
<b>Ação da Quantiscript® Reverse Transcriptase</b>	42°C	30 min
<b>Inativação da Quantiscript® Reverse Transcriptase</b>	95°C	3 min

#### 4.5.4. Iniciadores utilizados

Para o presente estudo foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 4) para o gene *hilA* e para os principais genes regulados pelo mesmo (*prgK*, *invH*, *hilC*, *sipA* e *sprB*), no intuito de monitorar e avaliar a modulação destes genes na ausência ou presença dos metabólitos estudados. Como controle para comparação da expressão relativa, foram sintetizados iniciadores para o gene *gapA*. Este gene codifica a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, uma enzima da via glicolítica que catalisa a oxidação e fosforilação de gliceraldeído 3 fosfato para 1,3 bifosfoglicerato (Nelson, Whittam e Selander, 1991). A escolha por *gapA* deve-se ao fato de representar um gene *housekeeping* cuja expressão é constitutiva, independente da regulação por *hilA*, além de ser um gene comumente utilizado como controle em ensaios de PCR em Tempo Real em bactérias.

#### 4.6. Análise dos genes de SPI-1

As expressões relativas de *hilA* e dos demais genes regulados por *hilA* (*prgK*, *invH*, *hilC*, *sipA* e *sprB*) foram analisadas através de RT qPCR da cepa selvagem SL1344 cultivada na presença e ausência do ácido 3-4, dimetilbenzoico (100  $\mu$ M), durante o período de 4 horas. Para a realização do qPCR foi utilizado o *SYBR®Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), segundo as recomendações do fabricante.

**Tabela 4:** Ciclo utilizado para a realização do qPCR para todos os genes do presente estudo.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Ativação da AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	95°C	15 seg	1x
Desnaturação	94°C	15 seg	
Anelamento	60°C	30 seg	45x
Extensão	72°C	30 seg	

Tabela 5: Relação dos iniciadores utilizados.

Sequência <i>Forward</i> (5'-3')	Sequência <i>Reverse</i> (3'-5')	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento	Gene Alvo
GGCGTAACCTTTGACAAAATACGAAGG	AGTCATCAGACCCTTCGATGATGCCG	126pb	60°C	<i>gapA</i>
CGGAAGTTAACGAAGAATCTCTTACC	GCCAAATGTATGAGTCGTAGGTTGCCG	172pb	60°C	<i>hilA</i>
CTTTTCTGCTGGTAATGACCCTTGCC	CCTCTATATTGTGCATTTGCAGAACGGC	114pb	60°C	<i>prgK</i>
TCCCTTCCTCCGTGACAAACC	TGATTTATTCTTCGCAAGGCTGACGGC	128pb	60°C	<i>invH</i>
ACGCTTAGTATGAGCGGAAATAGAAGGGC	GGCAACAAGTCCGCATGAAAAAATACTTTGG	170pb	60°C	<i>hilC</i>
GTCATAATGCCAGGTATGCAGACCG	CCTTTAAATTTCCCTGACACGCGTCG	113pb	60°C	<i>sipA</i>
CATTAAGTGCACCTTTTGCAATCCCTATCCG	GCCACTACCAAAAACCTTTACGGTTCTGCA	136pb	60°C	<i>sprB</i>

#### 4.7. Teste de invasão de células hospedeiras

Para o teste de invasão, utilizou-se o protocolo performado por Antunes e colaboradores (2014) e para tal procedimento, foram utilizadas culturas de células HeLa, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com alta concentração de glicose, 1X glutaplus, 1X aminoácidos não essenciais, 1X (100 unidades de penicilina e 0,1 mg de estreptomicina/ml) penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Durante a cultura das células constatou-se, através da observação por microscópio invertido, que o número médio de subculturas (passagens) para a melhor adaptação das células era de 2 subculturas. Levando em consideração tal observação, o ensaio de invasão foi realizado com células provenientes de 2 passagens, uma vez que as células haviam se adaptado ao meio de cultura após o descongelamento. As culturas da cepa SL1344, crescidas na presença e ausência do ácido 3,4-dimetilbenzoico, foram centrifugadas a 2500g por 2 minutos, as células bacterianas foram então ressuspensas em 3 mLs de DMEM e tiveram a quantidade de células estimadas através da leitura de densidade óptica (DO 600nm). Posteriormente, as células HeLa foram incubadas com as células bacterianas em uma proporção 1:10 (10<sup>5</sup> células HeLa para 10<sup>6</sup> células bacterianas), por 30 minutos à 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 30 minutos, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X (salina tamponada por fosfato; NaCl 1,37 M; KCl 2,7 mM; NaHPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) e incubadas novamente em DMEM com 100 µg/mL de gentamicina, por 1,5 hora. Após um total de 2 horas de incubação, as células foram lavadas novamente com PBS e lisadas com 250 µL de uma solução de 1% Triton X-100 e 0,1% SDS. Diluições seriadas foram semeadas em ágar LB contendo 100 µg/mL de estreptomicina, incubadas *overnight* e, posteriormente, realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), na placa de Petri.

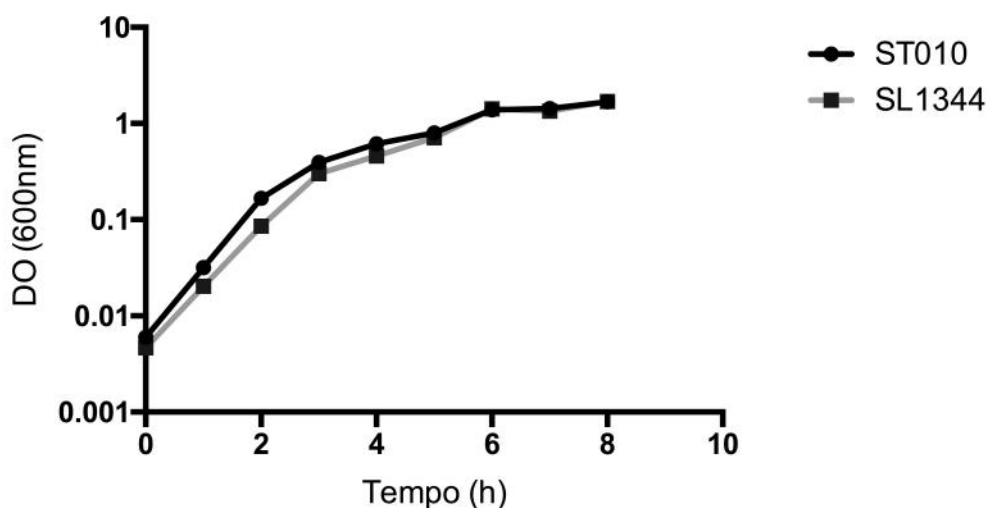
#### 4.8. Análises estatísticas

Para a análise estatística dos resultados obtidos no presente trabalho, foi utilizado o Teste t-Student não pareado. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram também analisados através da técnica de Grubbs para a detecção de *outliers*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Monitoramento do crescimento bacteriano

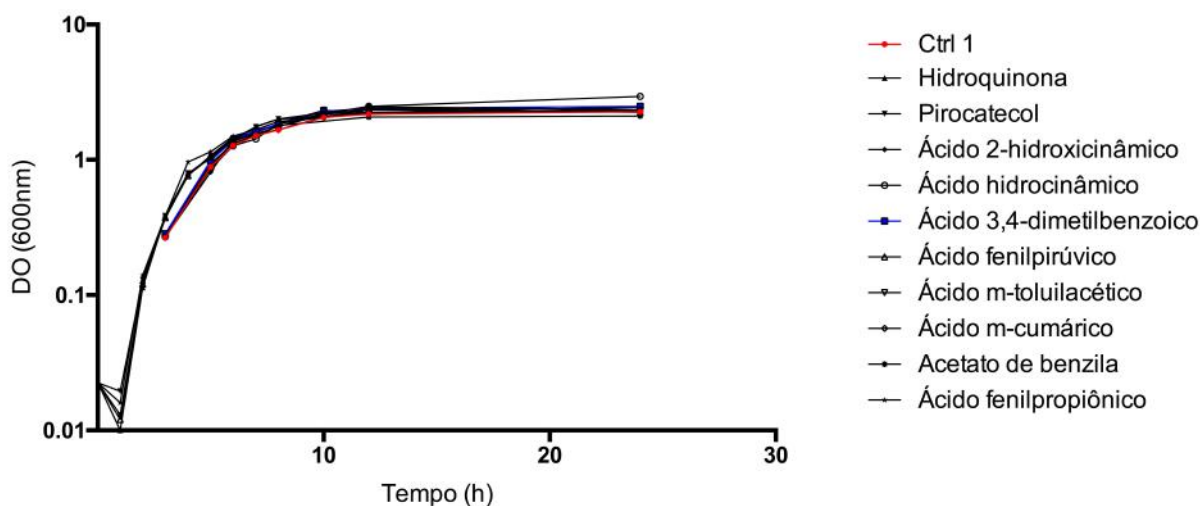
No intuito de avaliar a cinética de crescimento das cepas utilizadas no presente trabalho, através do monitoramento do crescimento bacteriano por meio de leitura da densidade óptica (DO 600nm) pôde-se observar que a cinética de crescimento da cepa com GFP fusionado ao promotor do gene *hilA* (ST010) assemelha-se à da cepa selvagem (SL1344) (Figura 5). Tal observação viabiliza a utilização da cepa ST010 como primeira alternativa para o monitoramento da expressão de *hilA*-GFP, através da citometria de fluxo, podendo-se assumir uma expressão semelhante na cepa selvagem SL1344.



**Figura 5:** Cinética de crescimento das cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium SL1344 e ST010, utilizando-se três réplicas para cada cepa. As barras representam o erro padrão da média.

Posteriormente a análise da cinética de crescimento das cepas, realizou-se o monitoramento do crescimento da cepa repórter ST010 na presença e ausência das moléculas escolhidas para este estudo. Por meio da análise das leituras de densidade óptica durante curvas de crescimento, pôde-se observar que a adição das moléculas separadamente na cultura bacteriana não interfere, ou pouco interfere, no crescimento da cepa utilizada (Figura 6).



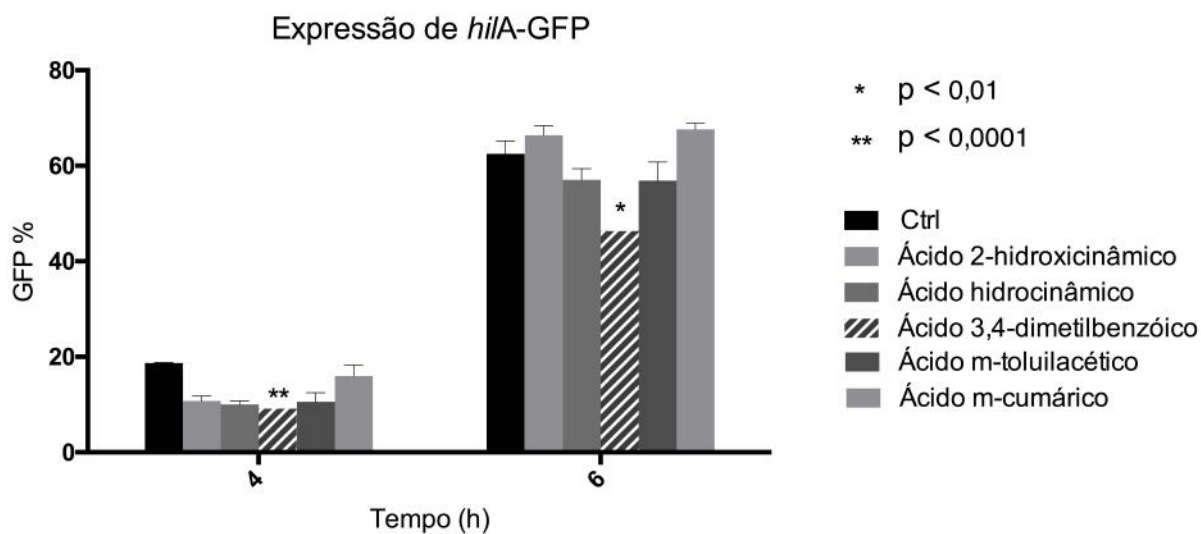


**Figura 6:** Cinética de crescimento da cepa ST010 na presença e ausência das moléculas selecionadas para o presente trabalho. Todas as análises foram realizadas com as moléculas na concentração de 100  $\mu$ M, utilizando-se duas réplicas para cada molécula testada. As barras representam o erro padrão da média.

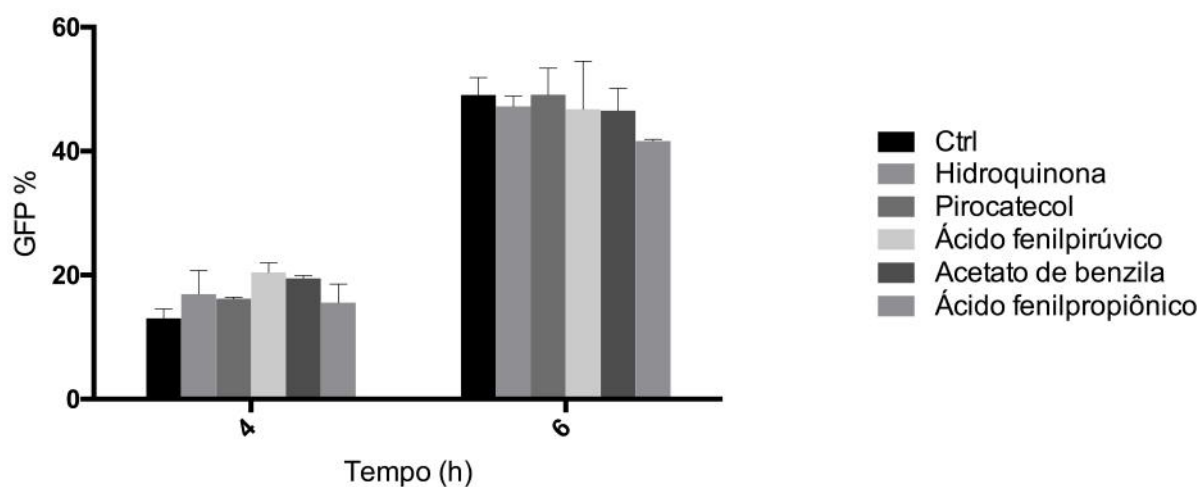
## 5.2. Análise da expressão de *hilA* através de citometria de fluxo

Uma vez constatado que a presença das moléculas na cultura bacteriana não apresenta um comprometimento da dinâmica de crescimento da cepa, realizou-se a análise da expressão de *hilA*-GFP da cepa ST010. Através da leitura da expressão por meio da técnica de citometria de fluxo, pôde-se estimar os possíveis efeitos da presença das moléculas testadas na expressão do gene *hilA* (Figuras 7 e 8). Observou-se que entre as dez moléculas testadas, a presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico demonstrou uma atividade considerável, causando uma maior repressão do gene *hilA* (Figura 7).

Apesar do monitoramento da expressão de *hilA*-GFP ter sido realizado nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12h, os dados representados nas figuras 7 e 8 dizem respeito, apenas, aos tempos de 4 e 6 horas devido ao fato de serem os pontos de leitura em que mais foi perceptível a ação do ácido 3,4-dimetilbenzoico. Tal achado, corrobora com estudos prévios nosso grupo (Antunes *et al.*, 2010) onde pôde-se observar que o tempo de 4 horas é o ponto de leitura mais propício para a avaliação destes compostos na expressão de *hilA*. As demais moléculas testadas não apresentaram nenhuma atividade significativa em nenhum dos pontos de leitura.



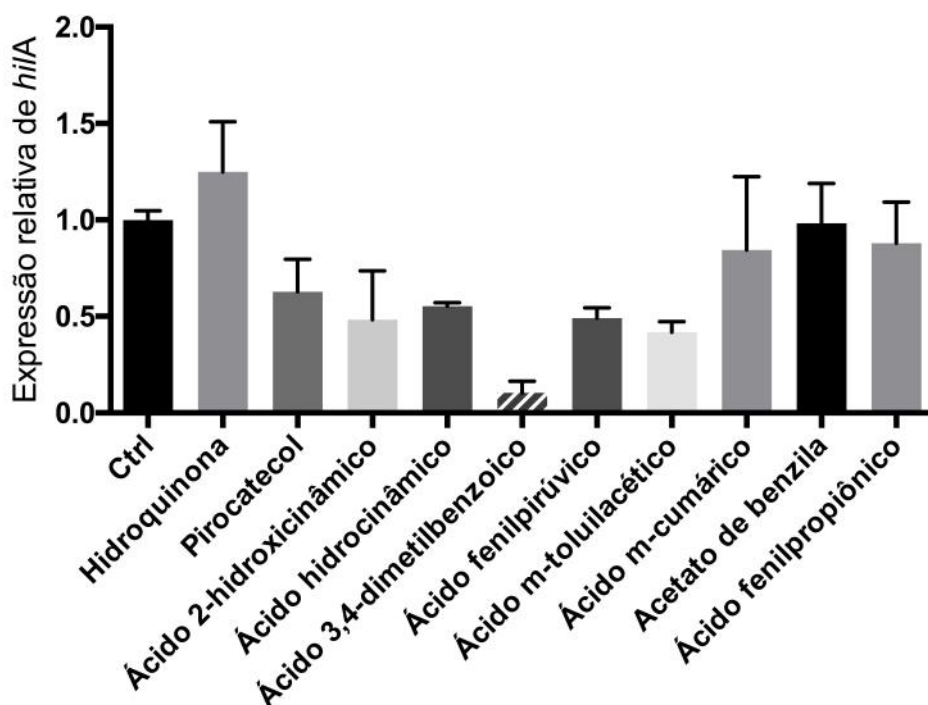
**Figura 7:** Análise por citometria de fluxo, da expressão de *hilA* na presença e ausência das moléculas selecionadas para o presente estudo. Observa-se uma atividade significativa do ácido 3,4-dimetilbenzóico, em destaque, na diminuição da expressão do gene *hilA* após quatro e seis horas de cultura da cepa ST010. Todas as análises foram realizadas com as moléculas na concentração de 100  $\mu$ M, utilizando-se duas réplicas para cada análise. As barras representam o erro padrão da média. Os testes estatísticos, evidenciados pelos asteriscos, estão relacionados ao controle.



**Figura 8:** Análise por citometria de fluxo, da expressão de *hilA* na presença e ausência das moléculas selecionadas para o presente estudo. Todas as análises foram realizadas com as moléculas na concentração de 100  $\mu$ M, utilizando-se duas réplicas para cada análise. As barras demonstram o erro padrão da média.

### 5.3. Análise da expressão de *hilA* através de qPCR

Com o objetivo de avaliar através de uma abordagem adicional e confirmar os resultados obtidos através da análise da expressão de *hilA* por citometria de fluxo, realizou-se uma qPCR no intuito de monitorar a expressão do referido gene da cepa selvagem SL1344, cultivada na presença e ausência das moléculas utilizadas no estudo, na concentração de 100 $\mu$ M após 4 horas de cultura bacteriana. Através da análise por qPCR pôde-se atestar os resultados anteriormente obtidos, onde observou-se uma ação expressiva do ácido 3,4-dimetilbenzoico na repressão de *hilA* (Figura 9).

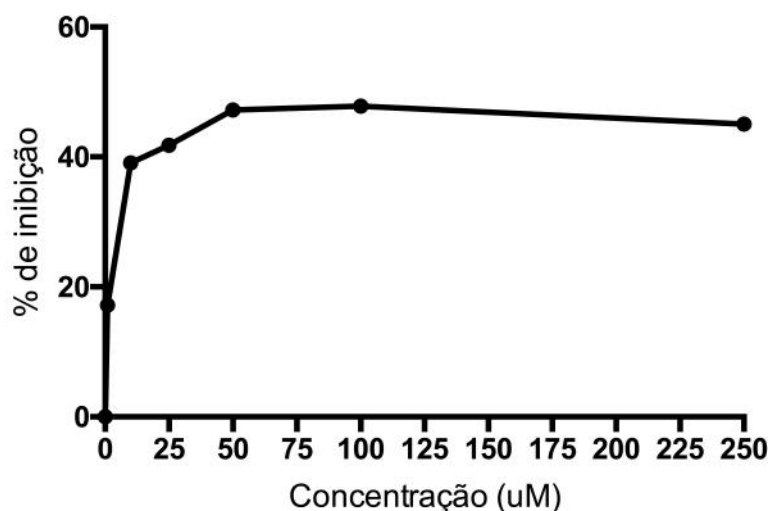


**Figura 9:** Expressão do gene *hilA* da cepa SL1344 na presença e ausência das diferentes moléculas na cultura bacteriana no tempo de 4 horas. Análise realizada através da técnica de qPCR, utilizando-se duas réplicas. As barras representam o erro padrão da média.

### 5.4. A atividade do ácido 3,4-dimetilbenzoico

Os resultados supracitados demonstram uma influência do ácido 3,4 dimetilbenzoico, na concentração de 100  $\mu$ M, sob a expressão gênica do gene *hilA* das cepas ST010 e SL1344. No intuito de avaliar se um aumento da concentração da molécula na cultura bacteriana acarretaria um aumento da atividade observada, foi realizada uma curva de dose resposta avaliando a porcentagem de inibição de *hilA* causada pela presença do ácido nas

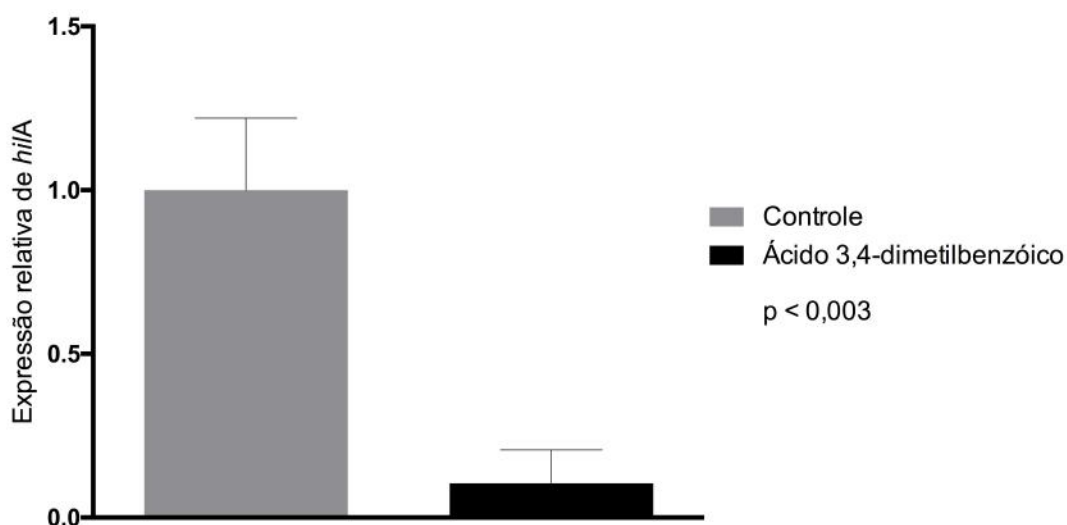
concentrações de 1, 10, 25, 50, 100 e 250 $\mu$ M, no tempo de 4 horas. Através desta análise pôde-se constatar que a atividade observada pela presença do referido ácido na cultura bacteriana atinge uma atividade constante a partir da concentração de 50 $\mu$ M, não ocorrendo alteração significativa com o aumento da concentração do ácido no meio de cultura.



**Figura 10:** Porcentagem de inibição na presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico na cultura bacteriana, em diferentes concentrações. Análise realizada através de citometria de fluxo, utilizando-se duas réplicas.

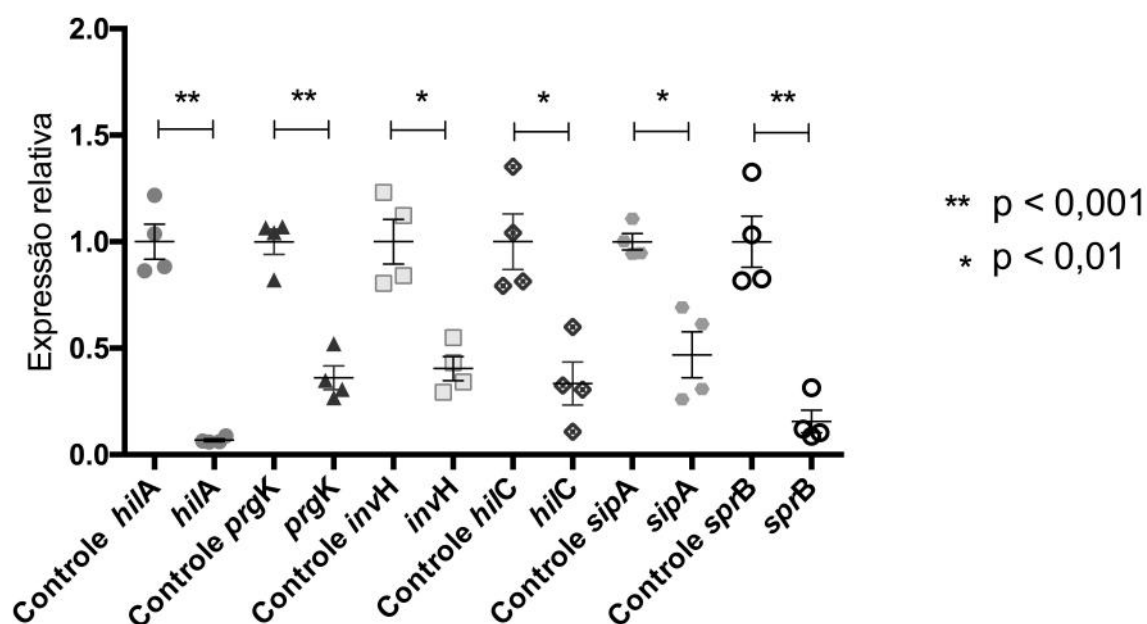
### 5.5. Modulação do gene *hilA*

Assim como o observado através das análises por citometria de fluxo e qPCR, dados demonstrados nas figuras 7, 8 e 9, foi realizado um qPCR para atestar o efeito do ácido 3,4-dimetilbenzoico na expressão gênica de *S. enterica* sorovar Typhimurium. Para a realização deste teste, utilizou-se a cepa selvagem SL1344 e através dos resultados obtidos foi possível observar uma forte repressão do gene *hilA* quando comparado ao controle (Figura 11), comprovando a atividade da molécula.



**Figura 11:** Expressão relativa do gene *hilA* na presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico. Foram utilizadas três réplicas para a análise. As barras representam o erro padrão da média.

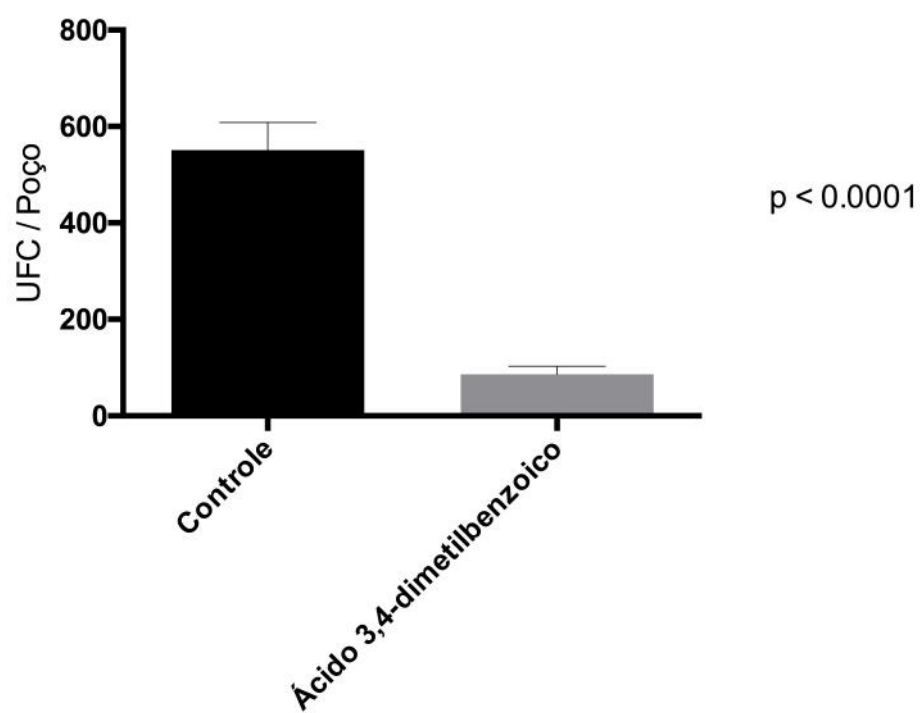
Com o objetivo de avaliar o impacto da repressão de *hilA* na SPI-1 causado pela presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico, as expressões de demais genes da SPI-1 regulados por *hilA* foram analisadas através da técnica de qPCR (Figura 12). Para tal análise, utilizou-se a cepa selvagem SL1344, cultivada na presença e ausência do ácido, durante o período de 4 horas. Os resultados obtidos demonstram que a presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico influencia, de fato, na inibição de genes importantes para a invasão de *S. enterica* sorovar Typhimurium. Neste resultado evidencia-se que a atividade de repressão do gene *hilA*, pela presença do ácido, implica na repressão dos genes *prgK*, *invH*, *hilC*, *sipA* e *sprB*.



**Figura 12:** Expressão relativa de genes transcritos na SPI-1. Análises realizadas através da técnica de qPCR, com a utilização de quatro réplicas. As barras representam o erro padrão da média. Os testes estatísticos, evidenciados pelos asteriscos, estão relacionados ao controle de cada gene.

## 5.6. Teste de invasão em células hospedeiras

Os resultados demonstrados acima sugerem que a ação do ácido 3,4-dimetilbenzoico, ao reprimir um dos principais fatores de virulência para o mecanismo de invasão celular, acarreta uma redução do potencial invasivo de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em células hospedeiras susceptíveis. Como esperado, através do teste de invasão em células HeLa, por meio da contagem de UFC do plaqueamento da cultura bacteriana não diluída, pôde-se comprovar que a cultura bacteriana na presença do referido ácido apresenta uma redução drástica do seu potencial invasivo na célula hospedeira, reduzindo cerca de 84% do número de UFC na presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico.



**Figura 13:** Ação da presença do ácido 3,4-dimetilbenzoico no potencial de invasão de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em células HeLa. O ensaio foi realizado com a utilização de cinco réplicas. A contagem de UFC foi realizada nas sementeiras no ágar LB a partir da cultura bacteriana sem diluição. As barras representam o erro padrão da média.

## 6. DISCUSSÃO

A microbiologia clássica foi fundamentada, basicamente, através das técnicas dependentes de cultivo microbiano. Desde Pasteur até os dias atuais, grande parte da microbiologia ainda é postulada de tal maneira. O surgimento das técnicas independentes de cultivo viabilizaram uma perspectiva mais abrangente dos fenômenos observados, possibilitando estudos mais diligentes dia após dia. A microbiota humana, por definição, trata-se de uma complexa comunidade microbiana presente nos mais diferentes sítios do corpo, e que coexiste de forma harmoniosa com o organismo humano (Sekirov, Russell e Antunes, 2010; Lozupone *et. al.*, 2012). Durante muito tempo perdurou-se a crença de que a formação da microbiota dava-se no momento do nascimento e evoluía através do tempo, juntamente com o organismo humano (Ottman *et. al.*, 2012). No entanto, estudos recentes colocam em cheque os credos, até então amplamente difundidos, sobre a origem de formação do microbioma humano (Aagaard *et al.*, 2014). Em 2014, Aagaard e colaboradores demonstraram indícios da presença de uma microbiota comensal na placenta, contrapondo a crença comum entre a comunidade científica da qual acreditava-se ser a placenta um sítio estéril. Outros sítios previamente considerados estéreis, como por exemplo os pulmões, possuem hoje uma microbiota vastamente estudada (Lee *et. al.*, 2015; Huang *et. al.*, 2011)

O estudo da microbiota do TGI representa o notável interesse por parte da comunidade científica pelo maior entendimento dos papéis do grande complexo microbiano que constitui a microbiota. Ao longo das últimas décadas, com a intensificação do estudo do microbioma humano, diversos trabalhos puderam estabelecer funcionalidades atribuídas à microbiota gastrointestinal (Tremaroli e Bäckhed, 2012). Atualmente, sabe-se da sua importância em diversos processos metabólicos que ocorrem no organismo humano, tais como a degradação de fibras alimentares (Tremaroli e Bäckhed, 2012) e a influência no metabolismo hormonal (Antunes *et al.*, 2011), por exemplo. Não só no contexto metabólico, a microbiota do TGI exerce papel fundamental no desenvolvimento do sistema imune e tem grande influência em diversas doenças crônicas como asma, obesidade e autismo (Palm *et al.*, 2015; Saraswati e Sitaraman, 2015).

Estima-se que a aparição dos primeiros microrganismos e organismos superiores datem de bilhões de anos atrás. Como citado anteriormente, a mútua influência de ambas partes, microbiota-hospedeiro, resultando em um processo de evolução conjunta, é atualmente amplamente aceita e evidenciada através dos mais diversos estudos sobre a microbiota.



Partindo deste pressuposto, é plenamente plausível supor que essa íntima relação entre microrganismos-hospedeiros, estabelecida ao longo de bilhões de anos e exemplificada pela microbiota gastrointestinal, represente uma co-evolução de centenas de milhares de anos, apresentando um caráter extremamente adaptado.

A maior parte da microbiota gastrointestinal é composta por microrganismo anaeróbios e altamente fastidiosos (Sekirov, Russell e Antunes, 2010). Devido a tais características, os estudos destes microrganismos apresentavam grande limitação até algumas décadas passadas. Através do advento de novas técnicas independentes de cultivo e o rápido avanço da biologia molecular e áreas correlatadas, foi possível despertar novas perspectivas de estudo não só para a microbiota gastrointestinal, mas também para a microbiota humana como um todo. A renovação do interesse pela microbiota do TGI serviu de provocação para diversos outros questionamentos das mais diversas funções da microbiota humana e elucidou algumas antigas indagações.

Juntamente à diversidade microbiana presente na microbiota gastrointestinal, a diversidade química encontrada é extremamente complexa, sendo a maioria das moléculas encontradas neste ambiente atualmente desconhecida (Antunes *et al.*, 2011). O presente trabalho demonstra a ação de uma pequena parte deste arcabouço químico pouco conhecido. Ainda que neste trabalho não tenha sido contemplado um estudo de sinergismo entre moléculas, e que a maioria das moléculas utilizadas não apresentem um efeito significativo quanto testadas separadamente, é totalmente aceitável crer na existência de um caráter sinérgico que possa desencadear ou mesmo potencializar a atividade de moléculas sabidamente funcionais, como a atividade do ácido 3,4-dimetilbenzoico descrita neste trabalho. Nossos achados sucedem os estudos de metaboloma realizados em 2014 por Antunes e colaboradores, onde foi demonstrado que a microbiota gastrointestinal apresenta, de fato, uma grande influência na composição metabólica do trato gastrointestinal, assim como o seu já conhecido papel na defesa do hospedeiro frente a patógenos invasores. A observação de que metabólitos produzidos pela microbiota intestinal podem reprimir a expressão de genes cruciais para a virulência de *Salmonella spp.* corrobora a hipótese do fenômeno de proteção, conferido pela microbiota gastrointestinal através da resistência a colonização, descrito desde o final da década de 1950 (Miller, 1959). A confirmação dessa hipótese abre precedentes para o fomento à pesquisa por novas perspectivas terapêuticas como uma alternativa para grandes questões de saúde dos dias atuais.

Estudos datados do final da década de 60 e início da década de 70 (Kempner e Hanson, 1968; Neelson, Platt e Hastings, 1970) discutem, pela primeira vez, um fenômeno que 20 anos depois ganharia o nome de quorum sensing. Tal fenômeno, hoje amplamente aceito como um mecanismo de comunicação ativo entre bactérias, atua através da produção e sensibilidade a pequenas moléculas, sendo capaz de regular a expressão gênica em diversas espécies (Fuqua, Winans e Greenberg, 1994; Antunes, 2007; Antunes *et al.* 2010) No contexto da microbiota gastrointestinal, considerando sua diversidade microbiana e química, é possível especular que tais mecanismos como o quorum sensing sejam amplamente difundidos. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o ácido 3,4-dimetilbenzoico, uma pequena molécula presente no metaboloma gastrointestinal, possui uma atividade na regulação da expressão gênica de *S. enterica* serovar Typhimurium (Figuras 7, 8 e 9), culminando na redução de até 84% da virulência do referido microrganismo (Figura 13). Tal resultado contribui para um melhor entendimento do potencial químico presente no microbioma gastrointestinal e dos mais diversos mecanismos mediados por pequenas moléculas, sugerindo uma alternativa de resposta para os atuais desafios da medicina.

É incontestável que a descoberta dos antibióticos revolucionou o cenário da medicina; porém seu uso indiscriminado ao longo do tempo deu origem ao fenômeno conhecido como resistência microbiana. Apesar de existir uma infinidade de linhas de pesquisa sobre resistência microbiana e áreas correlatas, a escassez de resultados promissores no desenvolvimento de novas drogas culminaram em uma preocupação sobre este fenômeno como uma futura ameaça global, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novas opções terapêuticas através de fontes de biodiversidade não convencionais. Sabe-se que uma grande parte dos antibióticos utilizados atualmente são produzidos a partir do metabolismo secundário de bactérias, e que o uso dessas substâncias em concentrações subinibitórias demonstram um caráter de sinalização (Goh *et al.*, 2002; Subrt, Mesak e Davies, 2011; Yim *et al.*, 2011). Tais observações reforçam um olhar mais atencioso para as moléculas sinalizadoras bacterianas atualmente conhecidas, e até então associadas somente a mecanismos de sinalização, como potenciais fontes de atividade antibiótica ou anti-virulência.

Desde os primórdios a ciência, e em mais específico a microbiologia, enfrentam um estigma quanto ao olhar para os microrganismos. Grande parte do senso comum sugeria uma visão nociva das bactérias, relacionando-as exclusivamente como potenciais agentes de transmissão de doenças. Mesmo com o avanço no campo científico, e a conseqüente remodelação do olhar para os microrganismos pela comunidade científica evidenciada pela indústria biotecnológica que se expande a cada dia, ainda há muito espaço para novas

perspectivas de exploração do potencial microbiano. Neste aspecto, a microbiota gastrointestinal humana entra como vanguarda em um potencial campo promissor. As hipóteses postuladas há 60 anos sobre as principais funcionalidades da microbiota gastrointestinal humana, firmadas mais recentemente, servem de fomento para a ressignificação do olhar para estes microrganismos.

Os resultados do presente trabalho expõem de forma mais elucidada a atividade de pequenas moléculas presentes no contexto da complexidade do microbioma gastrointestinal frente à *Salmonella enterica*, um patógeno invasor descrito há mais de 100 anos, porém com relatos associados ao gênero desde 430 A.C. (Littman, 2009). Através das observações realizadas ao longo de anos de estudos sobre a microbiota gastrointestinal, juntamente aos resultados obtidos no presente trabalho, é possível sugerir indícios da atividade protetora da microbiota como o efeito resultante de milhares de anos de co-evolução microbiota-hospedeiro. Ainda que existam muitas questões sobre a microbiota intestinal, e mais especificamente, seu metaboloma, tais achados aprofundam a hipótese validada por Antunes e colaboradores sobre o potencial da microbiota gastrointestinal como resposta à necessidade de novas perspectivas terapêuticas.

## 7. CONCLUSÕES

- O ácido 3,4-dimetilbenzóico não altera o crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium;
- O referido ácido é capaz de modular a expressão gênica de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium;
- A presença do ácido na cultura de *S. enterica* causa a repressão do gene *hilA*, principal regulador da Ilha de Patogenicidade 1 de *S. enterica*, e demais genes da SPI-1.
- A repressão do gene *hilA*, devido a presença do ácido 3,4-dimetilbenzóico, leva a repressão dos genes *prgK*, *invH*, *hilC*, *sipA* e *sprB*.
- A repressão do gene *hilA* implica em uma redução da virulência da estirpe selvagem SL1344 de *S. enterica* sorovar Typhimurium em até 84%.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J. e Versalovic, J. (2014). *Sci Transl Med.* 6, 237-265.
- Antunes, L.C.M. (2007). Quorum-sensing control of gene expression in *Vibrio fischeri*. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Graduate College of The University of Iowa, Iowa, 74f.
- Antunes, L. C. M., Ferreira, R. B. R., Buckner, M. M. C. e Finlay, B. B. (2010a). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology.* 156, 2271-2282.
- Antunes, L. C. M., Buckner, M. M. C., Auweter, S. D., Ferreira, R. B. R., Lolic, P. e Finlay, B. B. (2010). Inhibition of *Salmonella* host cell invasion by dimethyl sulfide. *Applied and Environmental Microbiology.* 76, 5300-5304.
- Antunes, L. C. M., Han, J., Ferreira, R. B. R., Lolic, P., Borchers, C. H. e Finlay, B. B., (2011). Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 55, 1494-1503.
- Antunes, L. C. M., Davies, J. E. e Finlay, B. B. (2011). Chemical signaling in the gastrointestinal tract. *F1000 biology reports.* 3, 4.
- Antunes, L. C., McDonald, J. A., Schroeter, K., Carlucci, C., Ferreira, R. B., Wang, M., Yurist-Doutsch, S., Hira, G., Jacobson, K., Davies, J., Allen-Vercoe, E. e Finlay, B. B. (2014). Antivirulence activity of the human gut metabolome. *mBio.* 5, 01183-14.
- Bajaj, V., Hwang, C. e Lee, C. A. (1995). *hila* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Molecular Microbiology.* 18, 715-727.
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A. e Welling, G. W. (2011). Anaerobe Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe.* 17, 478-482.
- Chen, L.M., Kaniga, K. e Galán, J.E. (1996). *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Molecular Biology.* 21, 1101-1115.
- Darwin, K. H. e Miller, V. L. (1999). Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clinical Microbiology Reviews.* 12, 405-428.
- Dehghani, B., Rasooli, I., Nadoushan, M. J., Owlia, P. e Rasooli, Z. (2014). Immunoprotectivity of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis virulence protein, InvH, against *Salmonella typhi*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences.* 17, 560-565.
- Ochoa. I. M. F. e Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* *Revista Latinoamericana de Microbiologia.* 47, 25-42.
- Fu, Y. e Galán, J.E. (1998). The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Molecular Microbiology.* 27, 359-368.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. e Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology.* 176, 269-275.
- Fuqua, C.; Parsek, M.R. e Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35, 439-468.
- Fuqua, C. e Greenberg, E.P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 685-695.
- Gal-mor, O. e Finlay, B. B. (2006). Microreview Pathogenicity islands : a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology.* 8, 1707-1719
- Galán, J.E. (2001). *Salmonella* Interactions With Host Cells : Type III Secretion At Work. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 53-86.
- Garai, P., Gnanadhas, D. P. e Chakravorty, D. (2012). *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* and *Typhi* as model organisms: Revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence.* 3, 377-388.
- Ginocchio, C. C., Olmsted, S. B. e Wells, C. L. (1994). Contact with Epithelial Cells Induces the Formation of Surface Appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell.* 76, 717-724.

- Goh, E. B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G. e Davies, J. (2002). Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 17025-17030.
- Goosney, D. L., Knoechel, D. G. e Finlay, B. B. (1999). Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: Masters of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerging Infectious Diseases.* 5, 216-223.
- Guinane, C. M. e Cotter, P. D. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease—understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6, 295–308.
- Han, J., Danell, R. M., Patel, J. R., Gumerov, D. R., Cameron, O., Speir, J. P., Parker, C. E., Rusyn, I., Zeisel, S. e Borchers, C. H. (2008). Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *NIH Public Access.* 4, 128–140.
- Huang, Y. J., Nelson, C. E., Brodie, E. L., Desantis, T. Z., Baek, M. S., Liu, J., Woyke, T., Allgaier, M., Wienerkronish, J. P., Sutherland, E. R., Tonya, S., Icitovic, N., Martin, R. J., Calhoun, W. J., Castro, M., Denlinger, L. C., Dimango, E. e Kraft, M. (2012). Airway Microbiota and Bronchial Hyperresponsiveness in Patients with Sub-optimally Controlled Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 127, 372–381.
- Hersh, D., Monack, D.M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S. e Zychlinsky, A. (1998). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Microbiology.* 96, 2396-2401.
- Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J. B. e Galan, J. E. (1996). A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology.* 21, 633-641.
- Kell, D. B. (2004). Metabolomics and systems biology: Making sense of the soup. *Current Opinion in Microbiology.* 7, 296–307.
- Kempner, E. S. e Hanson, F. E. (1968). Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *Journal of Bacteriology.* 95, 975-979.
- Lee, Y., Kim, K., Hwang, H.S., Lee, Y., Kwon, Y., Ko, E., Jung, Y.J., Lee, Y., Kim, M. e Kang, S. (2015). Innate and adaptive cellular phenotypes contributing to pulmonary disease in mice after respiratory syncytial virus immunization and infection. *Virology.* 485, 36-46.
- Littman, R. (2009). The Plague of Athens : Epidemiology and Paleopathology. *Mount Sinai Journal of Medicine.* 76, 456-467.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K. e Knight, R. (2012). Diversity , stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* 12, 220230.
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G. e Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands : big virulence in small packages. *Microbes and Infection.* 2000, 145–156.
- Miller, C. P. (1959). Protective action of the normal microflora against enteric infection: an experimental study in the mouse. *Med. Bull.* 25, 272-279.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. e Wilson, R K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *Nature.* 413, 852–6.
- Nealson, K. H., Platt, T. e Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology.* 104,313-322.
- Nelson, K., Whittam, T. S. e Selander, R. K. (1991). Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88, 6667–6671.
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M. e Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2, 1–11.
- Palm, N. W., Zoete, M. R., Flavell, R. A. e Haven, N. (2015). Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clin Immunol.* 159, 122-127.
- Peixoto, R. J. M., Miranda, K. R., Ferreira, E. O., de Paula, G. R., Rocha, E. R., Lobo, L. A. e Domingues, R. M. C. P. (2014). Production of AI-2 is mediated by the S-ribosylhomocystein lyase gene *luxS* in *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides vulgatus*. *Journal of Basic Microbiology,* 54, 644–649.
- Porter, S.B. e Curtiss, R. (1997). Effect of *inv* mutations on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks. *Avian Dis.* 41, 45-57.

- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., Van Den Brandt, P. A. e Stobberingh, E. E. (2006). Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics*. 118, 511–521.
- Que, F., Wu, S. e Huang, R. (2013). Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) at Work. *Curr. Microbiology*. 66, 582-587.
- Rajilic -Stojanovic, M. Hans G. H. J. H., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H. e de Vos, W. M. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: Analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology*. 11, 1736–1751.
- Rhen, M. e Dorman, C. J. (2005). Hierarchical gene regulators adapt Salmonella enterica to its host milieus. *International Journal of Medical Microbiology*. 294, 487–502
- Rychlik, I., Karasova, D., Sebkova, A., Volf, J., Sisak, F., Havlickova, H., Kummer, V., Imre, A., Szmolka, A., Saini, S. e Rao, C.V. (2010). SprB Is the Molecular Link between Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI1) and SPI4. *Journal of Bacteriology*. 192, 2459-2462
- Saraswati, S. e Sitaraman, R. (2015). Aging and the human gut microbiota-from correlation to causality. *Frontiers in Microbiology*. 6, 1–4.
- Schmidt, H. e Hensel, M. (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 17, 14–56.
- Schwartz, K.J. (1999). Salmonellosis. In: Diseases of swine. Straw, B.E; D'Allaire, S., Mengeling, W.L., eds (Oxford, Blackwell Science), pp.535-551.
- Sekirov, I., Russell, S. e Antunes, L. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*. 90, 859–904.
- Smith, D., Wang, J.H., Swatton, J. E., Davenport, P., Price, B., Mikkelsen, H., Stickland, H., Nishikawa, K., Gardiol, N., Spring, D. R. e Welch, M. (2006). Variations on a theme: diverse *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing mechanisms in gram-negative bacteria. *Sci. Prog.* 89, 167-211.
- Starling, E.H. (1905). The chemical correlation of the functions of the body. Lecture I. *Lancet* ii, 339 –341.
- Subrt, N., Mesak, L.R. e Davies, J. (2011). Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 979-984
- Tremaroli, V. e Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489, 242–249.
- Troisfontaines, P. e Cornelis, G.R. (2005). Type III Secretion: More Systems Than You Think. *Physiology*. 20, 326–339.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. a, Magrini, V., Mardis, E. R. e Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 444, 1027–31.
- Van Asten, A. J. A. M., Koninkx, J. F. J. G. e Van Dijk, J. E. (2005). *Salmonella* entry: M cells versus absorptive enterocytes. *Veterinary Microbiology*. 108, 149–152.
- Van Asten, A. J. A. M. e Van Dijk, J. E. (2005). Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 44, 251–259.
- Vázquez-Torres, A.; Jones-Carson, J.; Bäumlner, A.J.; Falkow, S.; Valvidia, R.; Brown, W.; Le, M.; Berggren, R.; Parks, W.T. e Fang, F.C. (1999). Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*. 401, 804-808.
- Vieira, M. (2009). Ilhas de patogenicidade. *O Mundo Da Saúde*, 33, 406–414.
- Wang, Y., Li, L., Shen, J., Yang, F. e Wu, Y. (2009). Quinolone-resistance in Salmonella is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. *Veterinary Microbiology*. 133, 328-334.
- Willing, B. P., Antunes, L. C. M., Keeney, K. M., Ferreira, R. B. R. e Finlay, B. B. (2011). Harvesting the biological potential of the human gut microbiome. *BioEssays*. 33, 414–418.
- Wisner, A., Desin, T., White, A., Potter, A. e Köster, W. (2012). The *Salmonella* Pathogenicity Island-1 and -2 Encoded Type III Secretion Systems. *Salmonella - A Diversified Superbug*. Mr. Yashwant Kumar, Ed. InTech,

pp. 469-494.

Yim, G., Wang, H. H. e Davies, J. (2007). Antibiotics as signalling molecules. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 362, 1195-1200.

Zhou, D., Mooseker, M.S. e Galán, J.E. (1999). An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Cell Biology.* 96, 10176-10181.