

Luciana Fachini da Costa

ESTUDO DE MECANISMOS DE PATOGENICIDADE UTILIZADOS PELA *SALMONELLA*
ENTERICA SOROTIPO TYPHIMURIUM E *SALMONELLA ENTERICA* SOROTIPO TYPHI NO
INTESTINO DE MODELOS ANIMAIS DE INFECÇÃO

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa da Pós Graduação em Patologia

Belo Horizonte – MG

2015

Luciana Fachini da Costa

ESTUDO DE MECANISMOS DE PATOGENICIDADE UTILIZADOS PELA *SALMONELLA*
ENTERICA SOROTIPO TYPHIMURIUM E *SALMONELLA ENTERICA* SOROTIPO TYPHI NO
INTESTINO DE MODELOS ANIMAIS DE INFECÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutora
em Patologia - área de concentração em
Patologia Investigativa.

Orientador: Professor Renato de Lima Santos

Coorientadora: Professora Tatiane Alves Paixão

Belo Horizonte

2015

C837e Costa, Luciana Fachini da.
Estudo de mecanismos de patogenicidade utilizados pela Salmonella enterica sorotipo typhimurium e Salmonella enterica sorotipo typhi no intestino de modelos animais de infecção [manuscrito]. / Luciana Fachini da Costa. -- Belo Horizonte: 2015.
116f.: il.
Orientador: Renato de Lima Santos.
Coorientador: Tatiane Alves Paixão.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Infecções por Salmonella. 2. Salmonella enterica/patogenicidade. 3. Modelos Animais. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Santos, Renato de Lima. II. Paixão, Tatiane Alves. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 269



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

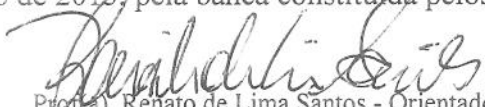
FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO DE MECANISMOS PATOGENICOS UTILIZADOS PELA SALMONELLA ENTERICA SOROTIPO TYPHIMURIUM E SALMONELLA ENTERICA SOROTIPO TYPHI NO INTESTINO DE MODELOS ANIMAIS DE INFECÇÃO


LUCIANA FACHINI DA COSTA

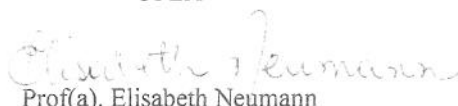
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 13 de agosto de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Renato de Lima Santos - Orientador
UFMG


Prof(a). Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
UFV


Prof(a). Geraldo Márcio da Costa
UFLA


Prof(a). Elisabeth Neumann
UFMG


Prof(a). Juliana Pinto da Silva Mol
UFMG


CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG

Belo Horizonte, 13 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Renato de Lima Santos, pela orientação, suporte, conselhos, e pelo grande exemplo de ser humano que é. Muito obrigada.

À professora Tatiane Alves Paixão, pela coorientação e pela amizade tão especial.

Aos colaboradores deste trabalho da UC Davis, em especial aos doutores Andreas Bäumlér, Renée Tsolis, Sebastian Winter e Maria Winter, que me instruíram e conduziram na realização dos experimentos.

Aos colaboradores deste trabalho da Escola de Veterinária da UFMG, que me auxiliaram na execução do projeto.

À Faculdade de Medicina da UFMG, pela oportunidade de realização do Doutorado.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela utilização do Laboratório da Patologia Molecular.

À Fazenda True Type São João, por conceder os bezerros para realização dos experimentos.

Aos professores, alunos e funcionários dos setores de Patologia Geral e Patologia Veterinária da UFMG presentes durante minha jornada na pós-graduação.

Aos amigos do laboratório da Escola de Veterinária da UFMG, pelo convívio alegre e pelos conhecimentos passados. Em especial, agradeço os amigos Érica, Juliana Mol, Teane, Valéria, Ana Patrícia, Auricélio, Andréia e Luize.

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos, senhor João e Alexandre, família tão presente e importante na minha vida.

A CAPES pela bolsa durante o doutorado na UFMG e ao CNPq e FAPEMIG pelos auxílios financeiros.

RESUMO

A salmonelose, uma das principais doenças de origem alimentar, é causada pela infecção por *Salmonella enterica*, bactéria Gram negativa pertencente à família Enterobacteriaceae. A infecção por *S. enterica* em seres humanos pode causar a enterite não-tifoide, que se caracteriza pelo quadro de enterite neutrofílica e é causada predominantemente por *S. enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, ou a febre tifoide, que se caracteriza por disseminação sistêmica de *S. enterica* sorotipos Typhi ou Paratyphi A, Paratyphi B ou Paratyphi C. Os objetivos deste trabalho foram avaliar mecanismos de patogenicidade de *S. Typhimurium* e de *S. Typhi* no intestino de animais usados como modelos experimentais de infecção. Buscou-se avaliar os mecanismos de absorção de ferro ferroso e férrico relacionados à sobrevivência intestinal de *S. Typhimurium* em condições de inflamação. Foram utilizados os modelos murino pré-tratado com estreptomicina, murino tratado com DSS a 3% e de ligadura cirúrgica de alças ilíacas de bezerro. Nos modelos murinos pré-tratado com estreptomicina e tratado com DSS a 3%, as coinfeções com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* ou *iroN* demonstraram que a absorção de ferro férrico mediada por IroN e TonB confere vantagem competitiva a *S. Typhimurium* em ambiente inflamado. Paralelamente, durante este trabalho foram estudados mecanismos que *S. Typhi* utiliza para suprimir a resposta inflamatória no ambiente intestinal. Foi demonstrado que a inserção do gene *tviA*, regulador da síntese da proteína Vi capsular de *S. Typhi*, no genoma de *S. Typhimurium* não altera a capacidade de invasão de *S. Typhimurium* mas causa diminuição do acúmulo de fluido e da inflamação no modelo de ligadura de alça ilíaca de bezerro. Os modelos de infecção animal demonstraram ser ferramentas importantes para avaliação dos mecanismos de patogenicidade tanto de *S. Typhimurium* quanto de *S. Typhi* no ambiente intestinal.

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most important foodborne diseases, and it is caused by *Salmonella enterica*, a Gram negative bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family. *S. enterica* infection in humans may cause non-typhoidal salmonellosis, characterized by enteritis with severe neutrophilic infiltration, and it is caused mostly by *S. enterica* serotypes Typhimurium and Enteritidis, or typhoid fever, which is characterized by systemic dissemination of serotypes Typhi, Paratyphi and A, B, or C. The goals of this study were to assess distinct pathogenic mechanisms of *S. Typhimurium* and *S. Typhi* in the intestine of animal models of infection. Mechanisms by which *S. Typhimurium* uptakes ferrous and ferric iron in the inflamed intestinal environment were evaluated. There were utilized streptomycin pre-treated mice, mice treated with 3% DSS, and bovine ligated ileal loops models. In mice pretreated with streptomycin and treated with 3% DSS, co-infections with reference strain and one of the mutants *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* or *iroN* indicated that absorption of ferric iron mediated by IroN and TonB provides competitive advantage to *S. Typhimurium* in the inflamed intestinal environment. In addition, mechanisms by which *S. typhi* represses inflammation in the intestine were investigated. Insertion of *tviA*, regulatory Vi capsular gene of *S. Typhi*, into the genome of *S. typhimurium* did not alter the invasion rate of *S. typhimurium* but resulted in decreased fluid accumulation and inflammation in the bovine ligated ileal loop model. In these studies, animal models have proven to be important tools for assessment of pathogenic mechanisms of both *S. Typhimurium* and *S. Typhi* in the intestinal environment.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	13
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 SALMONELOSE	13
1.2 SALMONELOSE HUMANA	14
1.3 MODELOS ANIMAIS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAIS	18
1.3.1 Modelo murino de infecção por <i>Salmonella</i>	18
1.3.2 Modelo bovino de infecção por <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	21
1.3.3 Outros modelos animais de infecção por <i>Salmonella</i> Typhimurium	23
1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA E DE PATOGENICIDADE DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM	24
CAPÍTULO II.....	27
ESTUDO DE MECANISMOS UTILIZADOS POR <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SOROTIPO TYPHIMURIUM PARA SOBREVIVER À PRIVAÇÃO DE FERRO EM MODELOS ANIMAIS	27
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	31
3.2 CEPAS DE BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO .	31
3.3 MODELO MURINO PRÉ-TRATADO COM ESTREPTOMICINA.....	32
3.4 MODELO MURINO TRATADO COM DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO (DSS).....	34
3.5 MODELO DE ALÇAS ILÍACAS DE BEZERROS CIRURGICAMENTE LIGADAS.....	34
3.6 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E RT-PCR QUANTITATIVO	35
3.7 HISTOPATOLOGIA.....	36
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

4.1	CONFIRMAÇÃO DO GENÓTIPO DAS MUTANTES <i>INVA TONB FEOB</i> , <i>INVA FEOB</i> E <i>INVA IRON</i> PROVENIENTES DA CEPA DE REFERÊNCIA DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i>	37
4.2	MULTIPLICAÇÃO DE MUTANTES <i>TONB FEOB</i> , <i>FEOB</i> , <i>TONB</i> E <i>IRON IN VITRO</i>	38
4.3	COLONIZAÇÃO INTESTINAL DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> E MUTANTES <i>TONB FEOB</i> , <i>FEOB</i> , <i>TONB</i> , OU <i>IRON</i> , OU CEPA MUTANTE DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM INVA</i> E MUTANTES <i>INVA TONB FEOB</i> , <i>INVA FEOB</i> , <i>INVA TONB</i> OU <i>INVA IRON</i> EM CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ESTREPTOMICINA	40
4.4	COLONIZAÇÃO INTESTINAL DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> E MUTANTES <i>TONB FEOB</i> , <i>FEOB</i> , <i>TONB</i> E <i>IRON</i> EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM DSS	47
4.5	COLONIZAÇÃO INTESTINAL DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> E MUTANTES <i>TONB FEOB</i> , <i>FEOB</i> , <i>TONB</i> , <i>IRON</i> , OU CEPA MUTANTE DE <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM INVA</i> E MUTANTES <i>INVA TONB FEOB</i> , <i>INVA FEOB</i> , <i>INVA TONB</i> OU <i>INVA IRON</i> EM BEZERROS COM ALÇAS ILÍACAS CIRURGICAMENTE LIGADAS.....	49
5.	CONCLUSÕES	51
CAPÍTULO III.....		51
PAPEL DOS GENES <i>VIAB</i> E <i>TVIA</i> DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SOROTIPO TYPHI NA EVASÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO INTESTINO DE BEZERROS COM ALÇAS ILÍACAS CIRURGICAMENTE LIGADAS		51
1.	INTRODUÇÃO	51
2.	OBJETIVOS	53
3.	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1	APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	53
3.2	CEPAS DE BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO .	54
3.3	MODELO DE ALÇAS ILÍACAS DE BEZERROS CIRURGICAMENTE LIGADAS.....	54
3.4	HISTOPATOLOGIA.....	55
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.	CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS		59

ANEXO A.....	70
ANEXO B.....	79
ANEXO C.....	999
ANEXO D.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> mais comuns em diferentes hospedeiros	14
Tabela 2. Cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium utilizadas	33
Tabela 3. Sequência de iniciadores utilizados em PCR convencional para confirmação de mutagênese em cepas <i>invA tonB feoB</i>, <i>invA feoB</i> e <i>invA tonB</i> de <i>Salmonella</i> Typhimurium	34
Tabela 4. Iniciadores usados para PCR em Tempo Real quantitativa (qRT-PCR)	36
Tabela 5. Cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium utilizadas	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transporte e absorção de ferro férrico e ferro ferroso pela *Salmonella* Typhimurium. Os receptores de membrana externa IroN e FepA ligam-se aos complexos salmoquelina-Fe³⁺ e enterobactina-Fe³⁺, respectivamente, e transportam o complexo sideróforo-Fe³⁺ através da membrana externa utilizando energia proveniente do complexo TonB/ExbB/ExbD. Durante processo inflamatório o hospedeiro secreta lipocalina-2, que se liga especificamente à enterobactina, impedindo a absorção do complexo enterobactina-Fe³⁺. O ferro Fe²⁺ é transportado pelo complexo FeoAB, presente na membrana interna da bactéria.

Figura 2. Confirmação dos mutantes de *Salmonella* Typhimurium por PCR. (A) Representação esquemática dos genes alvo e abordagem de mutagênese. A sequência de codificação de *tonB* e *feoB* foi interrompida com a inserção de um cassete de resistência a canamicina (Kan^R) ou tetraciclina (Tet^R). O gene *invA* foi interrompido pela inserção de um derivado de pGP704. A localização aproximada dos sítios de ligação de iniciadores é indicada pela meia-seta. (B) As cepas mutantes de *S. Typhimurium* indicadas serviram como amostras para a amplificação dos vários genes alvos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose. Marcadores de tamanho aproximado são indicados no lado esquerdo do painel.....

Figura 3. Multiplicação das cepas de *Salmonella* Typhimurium em meio rico em ferro e em meio com limitação de ferro disponível. As cepas de referência de *S. Typhimurium* (S.Tm) e mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* e *iroN* de *S. Typhimurium* foram inoculadas com valor de absorbância inicial de 0,01 em meio nutriente puro (NB), meio NB suplementado com de FeSO₄ 40 µM (+FeSO₄), FeCl₃ 40 µM (+FeCl₃) ou dipiridyl 0,2 mM (-Fe [dipiridyl]) e realizada mensuração de OD600 nm após 24 horas. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * indica diferença estatística comparada a mesma cepa em meio NB, teste de Tukey, * P<0,001. # indica diferença estatística entre cepas mutantes comparadas à cepa de referência nos mesmos tratamentos, teste de Tukey, # P<0,001.....

Figura 4. Inflamação intestinal em camundongos pré-tratados com estreptomicina e coinfectados com cepa referência e mutante de *Salmonella* Typhimurium. Camundongos C57Bl/6 foram coinfectados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1 x 10⁷ UFC

com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*, ou foram coinfectedados com a cepa mutante de *S. Typhimurium* *invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN*. (A) Escore histopatológico do ceco 48 hpi. As barras representam a média do escore histopatológico para inflamação de submucosa (IS), inflamação de mucosa (IM) e edema de submucosa (ES) de cinco camundongos por grupo. (B-C) Histopatologia de fragmentos de ceco coletados 48 hpi de camundongos coinfectedados com a cepa de referência e a mutante *iroN* de *S. Typhimurium* (B) ou com a *invA* e a mutante *invA iroN* de *S. Typhimurium* (C) corados por hematoxilina-eosina, 400x. * P<0,05..... 42

Figura 5. Quantificação de RNA mensageiro de ceco de camundongos pré-tratados com estreptomicina e coinfectedados com a cepa de referência e mutante de *Salmonella Typhimurium*. Camundongos C57Bl/6 foram coinfectedados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN* (S. Tm), ou foram coinfectedados com a cepa mutante de *S. Typhimurium* *invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN* (*invA*). (A-C) Transcrição de *cxcl-2* (A) *cxcl-1* (B) e *lipocalina-2* (C) em amostras de ceco 48 após infecção, medida por RT-PCR quantitativo. Os dados representam a média geométrica e erro padrão da variação de expressão (*fold change*) normalizada pela quantidade de transcrito de *gapdh* de cinco camundongos por grupo. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001..... 43

Figura 6. Colonização intestinal de camundongos pré-tratados com estreptomicina e coinfectedados com a cepa de referência e mutante de *Salmonella Typhimurium*. Camundongos C57Bl/6 foram coinfectedados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC da cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*, ou foram coinfectedados com a cepa mutante de *S. Typhimurium* *invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN*. Amostras de fezes coletadas 48 horas após a infecção (A) e amostras de ceco coletadas 96 horas após a infecção (B) para contagem bacteriana. Os dados estão expressos em média e erro padrão do índice de competitividade (IC) das cepas de referência de *S. Typhimurium* sobre mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN* (S. Tm) e do índice de competitividade (IC) das cepas mutante *invA* de *S. Typhimurium* sobre mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN* (*invA*) normalizados pela razão dos respectivos inóculos. * P<0,05; ** P<0,01..... 46

Figura 7. Inflamação intestinal em camundongos tratados com DSS e coinfectedados com cepa referência e mutante de *Salmonella Typhimurium*. Camundongos C57Bl/6 foram coinfectedados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*. (A-B) Escore histopatológico do ceco (A) e cólon (B) 48 hpi. As barras representam a média do escore histopatológico para inflamação de submucosa (IS), inflamação de mucosa (IM) e edema de submucosa (ES) de cinco animais por grupo coinfectedado. 47

Figura 8. Colonização intestinal de camundongos tratados com DSS e coinfectedados com cepa referência e mutante de *Salmonella Typhimurium*. Camundongos C57Bl/6 foram coinfectedados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*. Amostras de ceco (A) e cólon (B) coletadas após 48 horas de infecção para contagem bacteriana. Os dados estão expressos em média e erro padrão do índice de competitividade das cepas de referência de *S. Typhimurium* sobre mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN* (S.

Tm/mutante) normalizados pela razão dos respectivos inóculos em cinco animais por grupo coinfectado..... 48

Figura 9. Colonização intestinal em modelo de ligadura de alça ilíaca de bezerros e coinfectado com cepa referência e mutante de *Salmonella* Typhimurium. As alças ilíacas de bezerros foram ligadas cirurgicamente e coinfectadas na proporção 1:1 com mistura de 1×10^9 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*, ou foram coinfectados com a cepa mutante de *S. Typhimurium invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN*. Amostras de fluido intraluminal (A) e de biópsia de íleo (B) foram coletadas 8 horas após infecção para contagem bacteriana. Os dados estão expressos em média e erro padrão do índice de competitividade das cepas de referência de *S. Typhimurium* sobre mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN* (*S. Tm*) e do índice de competitividade das cepas mutante *invA* de *S. Typhimurium* sobre mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN* (*invA*) normalizados pela razão dos respectivos inóculos de 4 animais coinfectados..... 50

Figura 10. Colonização intestinal do modelo de ligadura de alça ilíaca de bezerros infectados com cepa de referência ou mutante *viaB*, *tviA* ou *invA* de *Salmonella* Typhimurium. As alças ilíacas de bezerros foram ligadas cirurgicamente e infectadas com 1×10^8 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* (*S. Tm*) ou uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *viaB*, *tviA*, *invA*. Amostras teciduais foram coletadas por biópsia após 5 horas de infecção para contagem bacteriana. Os dados estão expressos em média e erro padrão do Log de UFC/punch de quatro animais coinfectados. * $P < 0,05$ 56

Figura 11. Acúmulo de fluido luminal em modelo de ligadura de alça ilíaca de bezerros infectados com cepa referência ou mutante *viaB*, *tviA* ou *invA* de *Salmonella* Typhimurium. As alças ilíacas de bezerros foram ligadas cirurgicamente e infectadas com 1×10^8 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* (*S. Tm*) ou uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *viaB*, *tviA*, *invA*. A quantidade de fluido acumulado por alça ligada foi coletado 5 horas após infecção. Os dados estão expressos como percentual de resposta observado em relação à alça infectada com a cepa de referência (AJB715) de *S. Typhimurium*. As barras representam as média e erro padrão do Log de UFC/punch de quatro animais coinfectados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ 57

Figura 12. Inflamação no modelo de ligadura de alça ilíaca de bezerros e infectados com cepa de referência ou mutante *viaB*, *tviA* ou *invA* de *Salmonella* Typhimurium. As alças ilíacas de bezerros ligadas cirurgicamente foram infectadas com 1×10^8 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* (*S. Tm*) ou uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *viaB*, *tviA*, *invA*. (A) Fragmentos de íleo das alças ligadas foi coletado após 5 horas de infecção para avaliação do escore histopatológico. Barras representam a media do escore histopatológico para infiltrado neutrofílico (NE), hemorragia (HE), necrose/apoptose (NP) e edema (ED) de fragmentos obtidos de quatro animais infectados. (B-C) Histopatologia de fragmentos de íleo coletados 5 hpi inoculado com LB (B) ou infectados com a cepa de referência de *S. Typhimurium* (C), com a cepa mutante *viaB* (D), *tviA* (E) ou *invA* de *S. Typhimurium* (F) corados por hematoxilina-eosina, 600x. 58

CAPÍTULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 SALMONELOSE

A salmonelose, uma das principais doenças de origem alimentar em humanos e animais, é causada pela infecção por *Salmonella* spp., bactéria Gram negativa pertencente à família Enterobacteriaceae. A classificação atual da *Salmonella*, baseada em estudos de hibridização de DNA, considera que o gênero *Salmonella* inclui duas espécies: *Salmonella enterica* (com mais de 2500 sorotipos) e *Salmonella bongori* (com 22 sorotipos). *Salmonella enterica* incluem seis subespécies, subdivididas segundo características genômicas e reações bioquímicas: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (I), *Salmonella enterica* subespécie *salamae* (II), *Salmonella enterica* subespécie *arizonae* (IIIA), *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae* (IIIB), *Salmonella enterica* subespécie *houtenae* (IV) e *Salmonella enterica* subespécie *indica* (VI) (GRIMONT e WEILL, 2007). *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (referida neste trabalho como *S. enterica*) possui mais de 1500 sorotipos identificados (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014) e representa a subespécie de *Salmonella* com maior número de sorotipos isolados de humanos e animais.

Os sorotipos de *S. enterica* diferem quanto à variedade de hospedeiros susceptíveis e ao grau de adaptação ao hospedeiro (Tabela 1) (BÄUMLER *et al.*, 1998a; GRIMONT e WEILL, 2007). Alguns sorotipos de *S. enterica* têm predileção por uma determinada espécie de hospedeiro, mas podem eventualmente causar a doença em outras espécies. Este grupo de sorotipos restritos a determinados hospedeiros inclui: *S. enterica* sorotipo Choleraesuis (*S. Choleraesuis*) (CHIU *et al.*, 2004) e *S. enterica* sorotipo Dublin (*S. Dublin*) (HUGHES *et al.*, 1971), que preferencialmente infectam suínos e bovinos, respectivamente, mas que podem infectar humanos (FANG e FIERER, 1991). Há um segundo grupo de *S. enterica* que causa doença sistêmica em uma espécie, como os sorotipos Typhi (*S. Typhi*) e Paratyphi (*S. Paratyphi*), que infectam apenas humanos, e o sorotipo Gallinarum (*S. Gallinarum*), que infecta aves (BÄUMLER *et al.*, 1998a). A maioria dos sorotipos de *S. enterica*, no entanto, infectam várias espécies animais e o homem, e tendem a causar enterite no hospedeiro. A este

último grupo pertencem *S. enterica* sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) e *S. enterica* sorotipo Enteritidis.

Tabela 1. Sorotipos de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* mais comuns em diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Sorotipos
Homem	Typhimurium, Enteritidis (não tifoides) Typhi, Sendai, Paratyphi A, B e C (tifoides)
Bovinos	Typhimurium, Dublin
Aves	Pullorum, Gallinarum
Ovinos	Abortusovis
Suínos	Choleraesuis, Typhimurium, Typhisuis
Equinos	Abortusequi
Roedores selvagens	Typhimurium, Enteritidis

Fonte: Adaptada de BÄUMLER *et al.*, 1998a.

1.2 SALMONELOSE HUMANA

Salmonella spp. é um dos principais agentes causadores de infecção alimentar em seres humanos em todo o mundo. A infecção por *S. enterica* pode causar duas desordens distintas em seres humanos: a enterite não-tifoide e a febre tifoide. A enterite não-tifoide pode ser

causada por diversos sorotipos de *S. enterica*, sendo mais comuns os sorotipos Typhimurium (*S. Typhimurium*) e Enteritidis (*S. Enteritidis*) (FERNANDES *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2010). A febre tifoide é ocasionada pela infecção pelos sorotipos Typhi (*S. Typhi*) ou Paratyphi A, B ou C (*S. Paratyphi*). Os seres humanos são também susceptíveis a outros sorotipos, inclusive Choleraesuis (*S. Choleraesuis*) e Dublin (*S. Dublin*), sorotipos adaptados a suínos e bovinos, respectivamente, e que eventualmente podem causar um quadro de bacteremia em humanos (CHIU *et al.*, 2004; FANG e FIERER, 1991).

Estima-se que a infecção por *Salmonella* não-tifoide seja responsável por 93,8 milhões de casos de doença em humanos, sendo 80,3 milhões destes casos de origem alimentar, e 55 mil mortes por ano em todo o mundo (MAJOWICZ *et al.*, 2010). SCALLAN *et al.* (2011) demonstraram que a infecção por *Salmonella* não-tifoide é a responsável por 11% das doenças, 35% das hospitalizações e 28% das mortes atribuíveis a doenças de origem alimentar a cada ano nos Estados Unidos. Segundo HOFFMANN *et al.* (2012), o custo anual relacionado à enterite não-tifoide nos Estados Unidos é de \$3,3 bilhões.

A infecção por *S. Typhimurium*, causadora da enterite não tifoide, foi associada ao consumo de diversos produtos alimentares (JACKSON *et al.*, 2013). A transmissão ocorre por via fecal-oral, após ingestão de alimento de origem animal como leite, ovos e carne contaminados (OLIVER *et al.*, 2005; FEARNLEY *et al.*, 2011; MURASE *et al.*, 2000), pela ingestão de produtos de origem vegetal contaminados (CAVALLARO *et al.*, 2011; BENNETT *et al.*, 2014), ou pelo contato com água contaminada (AILES *et al.*, 2013). JACKSON *et al.* (2013) se referem a *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* como os dois principais sorotipos de *Salmonella* encontrados após levantamento de surtos ocasionados durante o período de 1998 a 2008 pelo Sistema de Vigilância de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos dos Estados Unidos (*Foodborne Disease Outbreak Surveillance System – FDOSS*). LEONARD *et al.* (2007) relacionaram adicionalmente tratamentos com antiácidos, antagonistas de receptor H₂ e inibidores de bombas de prótons em pacientes como fatores de risco para infecção por *Salmonella* não-tifoide.

Os animais de produção têm papel epidemiológico importante na transmissão de *Salmonella* não-tifoide em humanos (HOELZER *et al.*, 2011). KAGAMBÈGA *et al.* (2013) isolaram *S. enterica* em 53% de amostras de fezes de bovinos, aves domésticas e suínos sadios e demonstraram que alguns isolados de *Salmonella* possuíam similaridades gênicas e

multirresistência aos mesmos agentes antimicrobianos que amostras de *S. Typhimurium* isoladas de humanos. Em estudo desenvolvido por KUO *et al.* (2014), de 110 amostras de *S. enterica* isoladas de suínos, sendo em maior número o sorotipo *S. Typhimurium*, 96% foram multirresistentes a antibióticos e 48% possuíam padrões moleculares idênticos às amostras de *S. Typhimurium* isoladas de humanos. Além dos animais de produção, os animais de companhia e animais silvestres vêm desempenhando evidente importância na transmissão de *Salmonella* não-tifoide a outros animais e ao ser humano. WRIGHT *et al.* (2005) relataram quatro surtos de enterite não-tifoide em empregados, proprietários, e animais que estiveram em três clínicas veterinárias e em um abrigo de animais onde foram atendidos cães e gatos infectados por *S. Typhimurium*. CAVALLO *et al.* (2015) identificaram 43 indivíduos doentes infectados por *S. Typhimurium*, dentre os quais 88% referiram contato prévio com um alimento feito com frango e fabricado para animais de estimação (CAVALLO *et al.*, 2015). FINLEY *et al.* (2006) ressaltaram o risco de infecção por *Salmonella* em indivíduos cujos animais de estimação são alimentados com ingredientes naturais ou crus. MARIN *et al.* (2013) isolaram *S. Typhimurium* de tartarugas livres (*Trachemys scripta elegans*) e identificaram as tartarugas como importantes reservatórios de *Salmonella* não-tifoide para humanos.

A febre tifoide é uma enfermidade de alta morbidade ocasionada pela infecção pelos sorotipos Typhi (*S. Typhi*) ou Paratyphi A, B ou C (*S. Paratyphi*), sorotipos de *S. enterica* para os quais seres humanos são hospedeiros naturais estritos e reservatórios da infecção. Estudos retrospectivos desenvolvidos por CRUMP *et al.* (2004) reportaram que no ano de 2000 ocorreram mais de 20 milhões de doenças e 200 mil mortes, enquanto a infecção por *S. Paratyphi* acometeu clinicamente cinco milhões de pessoas em todo o mundo. A transmissão ocorre por via fecal-oral, pela ingestão de alimentos pobremente higienizados manipulados por indivíduos infectados ou pela ingestão de água não tratada contaminada pela bactéria eliminada nas fezes de indivíduos doentes ou portadores crônicos da infecção (CONNOR e SCHWARTZ, 2005). A incidência maior da febre tifoide é descrita em países em desenvolvimento, e ocorre em maior número nas regiões Centro-Sul da Ásia, Sudoeste, Oeste, Central e Leste da África e América Latina (CRUMP *et al.*, 2004; BUCKLE *et al.*, 2012). Nos Estados Unidos, a febre tifoide é menos frequente, com maior incidência em indivíduos que tenham viajado para outros países, e provoca preocupação em relação ao aparecimento de cepas de *S. Typhi* multirresistentes ao tratamento antimicrobiano (LYNCH *et al.*, 2009).

As manifestações clínicas da enterite não-tifoide e da febre tifoide são distintas. A enterite não-tifoide tem período de incubação de 6 a 72 horas após a infecção (hpi) e caracteriza-se clinicamente pela apresentação de gastroenterite autolimitante e não sistêmica, com diarreia profusa, dor abdominal, vômito menos frequentemente, e infecção local da porção distal do íleo, cólon e linfonodos mesentéricos dos humanos infectados (IMANISHI e CHAI, 2013). Biópsias retais de pacientes infectados por *S. Typhimurium* demonstraram edema de mucosa e infiltrado de células neutrofílicas (DAY *et al.*, 1978; MCGOVERN e SLAVUTIN, 1979). A histopatologia de tecidos obtidos de nove pacientes infectados por *S. Typhimurium* que foram a óbito evidenciou alterações sutis no estômago e intestino delgado, conquanto fragmentos de intestino grosso apresentaram colite difusa aguda com abundantes abscessos de criptas (BOYD 1985). O infiltrado neutrofílico pode ser visualizado em amostras de fezes dos pacientes infectados (HARRIS *et al.*, 1972).

Em pacientes imunossuprimidos, a infecção por *Salmonella* não-tifoide ocasiona uma síndrome denominada salmonelose não-tifoide invasiva, que resulta em bacteremia e pode gerar complicações como septicemia e meningite (MILLEDGE *et al.*, 2005; MOLYNEUX *et al.*, 2009). A bacteremia por *Salmonella* não-tifoide ocorre com maior prevalência em pacientes HIV positivos, crianças coinfectadas com malária e crianças malnutridas, tendo maior incidência em regiões da África Sub-Saária (GORDON, 2008; OKORO *et al.*, 2012; OKORO *et al.*, 2015). GENDREL *et al.* (1994) também relataram a associação entre a bacteremia induzida por *Salmonella* não-tifoide e infecção por *Schistosoma intercalatum* em crianças africanas. O sinal clínico mais frequente relacionado à infecção por *Salmonella* não-tifoide invasiva é febre; a diarreia nos casos de infecção por *Salmonella* não-tifoide invasiva é menos frequente e geralmente pouco proeminente quando ocorre (FEASEY *et al.*, 2012).

Na febre tifoide, o indivíduo infectado desenvolve enfermidade sistêmica caracterizada mais frequentemente por febre persistente, dores abdominais, perda de apetite, hepato e esplenomegalia (DAS *et al.*, 2014; KHANAM *et al.*, 2015). *S. Typhi* instala-se inicialmente no íleo, onde se adere e invade as células epiteliais intestinais, através das quais *S. Typhi* transloca-se para folículos linfoides intestinais e linfonodos mesentéricos (DE JONG *et al.*, 2012). Durante exame microscópico de conteúdo fecal de pacientes com febre tifoide observam-se acúmulo de células inflamatórias, predominantemente histiócitos, e de hemácias (DAS *et al.*, 2014). A enterite é caracterizada histologicamente por edema e infiltração de linfócitos, monócitos, plasmócitos e histiócitos (EDSALL *et al.*, 1960), o que resulta em

marcante hipertrofia da mucosa ileal (KRAUS *et al.*, 1999). A bactéria atinge a corrente sanguínea e dissemina-se para órgãos sistêmicos como baço, fígado, medula óssea, vesícula biliar e placas de Peyer (DE JONG *et al.*, 2012). Aproximadamente 2 a 5% dos indivíduos infectados por *S. Typhi* desenvolvem o estado de portadores crônicos, com infecção do trato biliar e eliminação intermitente de *S. Typhi* no conteúdo fecal durante anos (GUNN *et al.*, 2014). Na vesícula biliar, *S. Typhi* adere e invade as células epiteliais, onde forma biofilmes de *S. Typhi* associados a infiltrado de histiócitos, ausência relativa de neutrófilos e dano do epitélio vesicular, com extrusão das células epiteliais (GONZALEZ-ESCOBEDO e GUNN, 2013). A secreção de bile com *S. Typhi* possibilita a infecção secundária das placas de Peyer, via ciclo entero-hepático (GORDON, 2008), o que favorece o aparecimento de lesões em placas de Peyer devido à isquemia e necrose teciduais, e que podem levar a ulceração das placas de Peyer, com consequente hemorragia ou perfuração intestinais (PARRY *et al.*, 2002). Além da hemorragia e perfuração intestinais, a febre tifoide severa pode ocasionar complicações como hepatite, encefalopatia, miocardite, efusão pleural ou pneumonia e choque hemodinâmico (PARRY *et al.*, 2002; PARRY *et al.*, 2014).

1.3 MODELOS ANIMAIS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAIS

1.3.1 Modelo murino de infecção por *Salmonella*

O modelo de infecção em murino oferece vantagens nos estudos de patogenia de diversos patógenos, uma vez que o manejo dos animais é simples e a variabilidade genética desenvolvida nos camundongos permite o uso de animais imunologicamente resistentes ou mesmo que possuam supressão de algum gene relacionado (camundongo *knockout*) (Barthel *et al.*, 2003). Entretanto, particularmente para o estudo da salmonelose, o modelo possui limitações de utilização (Tsolis *et al.*, 2011).

Considerando as infecções naturais, a *S. Typhi* infecta exclusivamente o ser humano. O único modelo animal de infecção experimental que, uma vez infectado via oral por *S. Typhi*, desenvolve uma síndrome similar à febre tifoide humana é o chimpanzé (EDSALL *et al.*, 1960). Em camundongos, CARTER e COLLINS (1974) demonstraram que *S. Typhi* e *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* ou *S. Paratyphi C* não multiplicam em fígado e baço 24 hpi. O'BRIEN (1982) buscou diminuir a falha de multiplicação de *S. Typhi* em modelo murino por meio da inoculação intraperitoneal ou intravenosa de *S. Typhi* somada ao tratamento com

quelante de ferro anterior e posterior à infecção. POWELL *et al.* (1980) induziram infecção letal em camundongos pela inoculação intraperitoneal de *S. Typhi* ressuspensa em mucina. Entretanto, a morte destes camundongos inoculados ocorreu por choque endotóxico devido à rápida expansão de colonização da *S. Typhi*. Estudos mais recentes têm utilizado o modelo de camundongos humanizados para serem infectados por *S. Typhi* (MIAN *et al.*, 2011). Camundongos Balb/c alinfóides mutantes transplantados com célula sanguínea de cordão umbilical humano e infectados por *S. Typhi* por via intravenosa desenvolvem infecção bacteriana, onde *S. Typhi* coloniza baço, fígado, sangue e medula óssea e os animais apresentam maior perda de peso (MIAN *et al.*, 2011).

A infecção experimental de *S. Typhimurium* no modelo murino resulta em uma enfermidade que se assemelha à febre tifoide humana. Em camundongos, a infecção por *S. Typhimurium* induz disseminação sistêmica da bactéria, com colonização do baço e fígado associada à hepato e esplenomegalia e infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear no intestino dos animais inoculados (SANTOS *et al.*, 2001a). A infecção por *S. Typhimurium* em camundongos é, portanto, aceita como modelo para estudo da febre tifoide em humanos, e tem sido utilizada para estudar os mecanismos de interação hospedeiro-patógeno em camundongos, os fatores de virulência relacionados à bacteremia causada por *Salmonella*, a patogenia de infecção por *Salmonella* em portadores crônicos, e a aplicabilidade de modelos terapêuticos e vacinais para *S. Typhi* (TSOLIS *et al.*, 2011).

Há diferença de susceptibilidade à forma letal de infecção por *S. Typhimurium* segundo a linhagem animal utilizada. Camundongos das linhagens Balb/c e C57Bl/6 são altamente susceptíveis a salmonelose sistêmica grave depois de infectados por *S. Typhimurium*, por possuírem mutação no alelo do gene *slc11a1*, também denominado *Nramp 1*. Por outro lado, camundongos *Nramp*^{+/+}, como os das linhagens CBA ou 129sv, sobrevivem à infecção sistêmica de *S. Typhimurium* (TSOLIS *et al.*, 2011).

O modelo murino de infecção por *S. Typhimurium* foi adaptado por JONES *et al.* (1994) com a ligadura de porções do íleo de camundongos Balb/c anestesiados e posterior infecção por *S. Typhimurium* para estudo ultraestrutural das placas de Peyer. Neste modelo, observou-se que *S. Typhimurium* adere às células M das placas de Peyer e causa destruição destas células, seguida por invasão das células epiteliais e células linfóides adjacentes.

Os camundongos da linhagem Balb/c são usualmente utilizados como modelo animal para infecção aguda de *S. Typhimurium*, mas esses animais não possibilitam o estudo sobre a infecção persistente por *Salmonella*. O modelo murino para febre tifoide é útil para compreensão da fase tardia da infecção por *S. Typhi* em humanos, posto que a *S. Typhi* possui período de incubação mais longo que *S. Typhimurium* e pode persistir por longos períodos em um ser humano infectado. Pelo uso de camundongos *Nramp*^{+/+} infectados com *S. Typhimurium* é possível estudar a apresentação crônica da *Salmonella* tifoide. Em camundongos 129sv, *S. Typhimurium* persiste em linfonodos mesentéricos por até um ano após infecção (MONACK *et al.*, 2004).

Adicionalmente, o uso de animais “knockout” é ferramenta de estudo sobre a resposta imunológica induzida por patógenos que pode ser utilizado pela inoculação em camundongos, predominantemente da linhagem C57Bl/6. Em camundongos “knockout” *tlr11*^{-/-} infectados experimentalmente, a *S. Typhi* coloniza baço, fígado, rim e linfonodos mesentéricos e causa mortalidade em 100% dos animais inoculados antes de 20 dias após a infecção (MATHUR *et al.*, 2012).

O tratamento prévio com estreptomicina em dose única (20 mg) em camundongos C57Bl/6 e Balb/c altera a microbiota intestinal e interfere na resistência à colonização por *S. Typhimurium* (STECHEER *et al.*, 2007). A colonização do ceco de camundongos infectados por *S. Typhimurium* neste modelo ocorre entre 2 a 8 hpi, atingindo nível estável até 20 hpi oral. Às 20 hpi, a inflamação intestinal localiza-se no ceco e região proximal do cólon do camundongo e é caracterizada macroscopicamente pelo ceco pálido e diminuído de tamanho, e microscopicamente por edema de submucosa, diminuição do número de células caliciformes, infiltrado inflamatório neutrofílico e erosão epitelial ou ulceração da mucosa intestinal (BARTHEL *et al.*, 2003). Às 48 hpi são observados sinais de inflamação cecal acentuada, com intenso edema de lâmina própria, alterações nas estruturas das criptas, intenso infiltrado inflamatório neutrofílico na submucosa, lâmina própria e mucosa (BARTHEL *et al.*, 2003).

Os sinais de inflamação intestinal neutrofílica aguda em camundongos pré-tratados com estreptomicina e infectados com *S. Typhimurium* mimetizam os que ocorrem nos casos de enterite não-tifoide em humanos e justificam a utilidade do modelo murino pré-tratado com estreptomicina e infectado com *S. Typhimurium*. Uma limitação do modelo murino pré-

tratado com estreptomicina é a própria modificação que o antibiótico causa na microbiota préexistente à infecção por *S. Typhimurium* (TSOLIS *et al.*, 2011) e o fato de que mesmo com o pré-tratamento com estreptomicina, *S. Typhimurium* apresenta disseminação sistêmica, podendo ser possível observar colonização bacteriana em linfonodos mesentéricos, baço e fígado dos camundongos infectados (BARTHEL *et al.*, 2003).

No modelo murino utilizando animais “germ free”, que não possuem microbiota intestinal, ocorre susceptibilidade à infecção por diversos agentes, incluindo *S. Typhimurium*. *S. Typhimurium* coloniza o ceco de camundongos “germ free” eficientemente nos tempos 8 e 20 hpi intragástrica e causa inflamação cecal caracterizada por edema de submucosa, infiltrado inflamatório neutrofílico e destruição do epitélio cecal, com perda de células caliciformes e erosão ou ulceração do epitélio. Os danos epiteliais em camundongos “germ free” infectados por *S. Typhimurium* são maiores que os danos epiteliais em camundongos também infectados pré-tratados com estreptomicina (STECHEER *et al.*, 2005). Recentemente tem se tornado cada vez mais evidente a complexa interação entre *Salmonella* e a microbiota intestinal e os mecanismos utilizados pela *Salmonella* para ganhar vantagem competitiva sobre a microbiota no ambiente intestinal inflamado (revisado por SANTOS, 2014).

1.3.2 Modelo bovino de infecção por *Salmonella* Typhimurium

Em bovinos, a infecção por *S. Typhimurium* resulta em alta morbidade e mortalidade. Os bovinos estão entre os principais reservatórios de *Salmonella* para demais bovinos contactantes e outras espécies animais (RINGS, 1985). A manifestação clínica mais frequente da infecção por *S. Typhimurium* nestes animais é a diarreia aguda, que se inicia em até 48 hpi, e que é semelhante a que ocorre em seres humanos infectados por *S. Typhimurium*. Pela razão de bovinos serem hospedeiros naturais da *S. Typhimurium*, e pelo fato de apresentarem enterite profusa com infiltrado inflamatório neutrofílico, o modelo bovino de infecção por *S. Typhimurium* vem sendo utilizado e é adequado para estudos concernentes à diarreia induzida por *Salmonella* (COSTA *et al.*, 2012¹).

Bezerros infectados por via oral com *S. Typhimurium* desenvolvem anorexia, febre,

¹ O artigo científico escrito por Costa et al. (2012) consiste de Revisão de Literatura intitulada “Salmonellosis in cattle: advantages of being an experimental model.” gerada durante o desenvolvimento desta tese de doutorado (Anexo A).

desidratação, prostração e diarreia devido à enterite fibrino-necrótica com infiltrado inflamatório difuso intenso composto predominantemente de neutrófilos (TSOLIS *et al.*, 1999). Esses sinais clínicos e lesões estão associados à diminuição de proteínas (apesar da desidratação), neutropenia e desequilíbrio ácido-básico no sangue periférico (SANTOS *et al.*, 2002a). Além da via oral de infecção, o procedimento cirúrgico de ligadura de alça ilíaca de bezerros e inoculação intraluminal de *S. Typhimurium* tem sido utilizado em modelos experimentais que estudam as respostas do hospedeiro e os fatores de virulência presentes durante a infecção por *Salmonella* (TSOLIS *et al.*, 2011).

A infiltração de células neutrofílicas no intestino de bezerros infectados por *S. Typhimurium* via oral induz perda de integridade epitelial e efusão de exsudato rico em proteínas para o lúmen intestinal e contribuem para a ocorrência de diarreia (SANTOS *et al.*, 2001a). No modelo de ligadura cirúrgica de alça ilíaca de bezerro, o fenômeno da diarreia é mimetizado, posto que ocorre distensão da alça ilíaca inoculada devido ao acúmulo de fluido intraluminal. Com isto, o modelo de ligadura de alça ilíaca de bezerro é útil para verificar a patogenia da enterite não-tifoide e as interações moleculares entre fatores de virulência da *S. Typhimurium* e a célula intestinal infectada que resultam em inflamação e secreção de fluido intestinal (COSTA *et al.*, 2012). O acúmulo de fluido intraluminal no modelo de ligadura de alça ilíaca inicia-se 3 hpi por *S. Typhimurium* e 2 horas após o início da resposta inflamatória neutrofílica aguda (SANTOS *et al.*, 2001b).

O modelo de ligadura cirúrgica de alça ilíaca de bezerro possibilita o estudo *in situ* de lesões patológicas causadas no início da infecção por *S. Typhimurium* e os genes que apresentam expressão aumentada ou diminuída em decorrência da resposta inflamatória intestinal induzida pela *S. Typhimurium*. Durante a infecção pela cepa selvagem de *S. Typhimurium* em porções do íleo de bezerro ligadas cirurgicamente, LAWHON *et al.* (2011) reportaram mais de 700 genes com expressão de RNA alterada para valores superiores ou inferiores aos valores de expressão dos mesmos genes em fragmento ileal não infectado. O início da intensa atividade de expressão dos genes nas alças inoculadas com cepa selvagem de *S. Typhimurium* ocorre 1 hpi, e é marcado por um segundo pico em períodos pós-infecção mais tardios (LAWHON *et al.*, 2011). A invasão das células M das Placas de Peyer do íleo inicia-se 15 minutos após infecção e a invasão das células está associada a uma resposta inflamatória neutrofílica aguda e intensa, com aumento da transcrição de RNA para *cxcl-8 (il-8)*, *cxcl-1 (gro- α)*, *cxcl-3 (gro- γ)* e *cxcl-6 (gcp-2)* 1 hora após infecção por *S. Typhimurium* (SANTOS *et*

al., 2002b). Com 2,5 horas de infecção por *S. Typhimurium*, os fragmentos de íleo de bezerros submetidos cirurgicamente à ligadura de alça possuem diminuição da transcrição do RNA de uma ATPase de membrana plasmática transportadora de cálcio (PMCA) homóloga à PMCA humana (SANTOS *et al.*, 2002c). A PMCA é responsável pelo transporte de cálcio do citoplasma para o meio extracelular, e a redução na expressão do gene PMCA pode contribuir para ocorrência da resposta inflamatória neutrofílica na patogenia da diarreia (SANTOS *et al.*, 2002c).

1.3.3 Outros modelos animais de infecção por *Salmonella Typhimurium*

Outros modelos animais têm sido utilizados com menor frequência para estudar a infecção por sorotipos de *S. enterica*. Os primatas desenvolvem sinais clínicos similares aos sinais apresentados por seres humanos após infecção por *S. enterica*. Os macacos Rhesus apresentam resistência à infecção por *S. Typhi*, entretanto a infecção pode ser induzida por via oral em chimpanzés (EDSALL *et al.*, 1960).

Os macacos Rhesus são susceptíveis à infecção por *S. Typhimurium* e após 24 hpi apresentam sinais parecidos com os da infecção alimentar por *S. Typhimurium* em humanos. A diarreia em macacos Rhesus infectados por *S. Typhimurium* pode durar vários dias. As lesões intestinais em macacos Rhesus infectados por via oral com *S. Typhimurium* localizam-se predominantemente no cólon, embora os animais manifestem lesões também no jejuno e íleo (KENT *et al.*, 1966). A colite intensa está associada à diarreia moderada e inibição da absorção de fluidos pelo intestino. A diarreia está relacionada como a invasão de *S. Typhimurium* pela mucosa do jejuno e íleo (ROUX *et al.*, 2010).

O modelo primata tem sido utilizado para estudos da infecção por *S. Typhimurium* em pacientes imunocomprometidos. Nestes pacientes, *S. Typhimurium* gera uma enfermidade invasiva com complicações graves, incluindo meningite, osteomielite ou choque séptico. A salmonelose não-tifoide invasiva ocorre com maior frequência em pacientes HIV positivos e em crianças coinfectadas por malária (Tsolis *et al.*, 2011). Estudos que utilizam macacos Rhesus infectados pelo vírus da imunodeficiência simia (SIV) e inoculados com *S. Typhimurium* em modelo de ligadura cirúrgica de íleo possibilitaram um modelo para estudo do vírus HIV. Neste modelo primata, a infecção pelo vírus SIV causa depleção das células T CD4⁺, debela a resposta imune IL-17 e induz invasão intestinal e disseminação sistêmica de *S.*

Typhimurium (RAFFATELLU *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2011).

1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA E DE PATOGENICIDADE DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

O genoma de *S. Typhimurium* difere do genoma da *Escherichia coli* (*E. coli*) em apenas 20% da sua composição (MCCLELLAND *et al.*, 2001). MILLS *et al.* (1995) referem a aquisição de sequências de DNA por *S. Typhimurium* ao longo do processo evolutivo que codificam genes relacionados à invasão celular e estão ausentes na região cromossomal correspondente de *E. coli*. Estes genes formam a Ilha de Patogenicidade 1 (SPI-1), presente na *S. enterica* e ausente em bactérias comensais (BÄUMLER, 1997), e codificam o Sistema de Secreção Tipo III associado à invasão (T3SS-1). SHEA *et al.* (1996) reconheceram outro *locus* conservado no genoma da *S. enterica* e ausente em *E. coli* que denominaram ilha de patogenicidade 2 (SPI-2), do sistema de secreção tipo III (T3SS-2). Os genes localizados nas Ilhas de Patogenicidade codificam importantes fatores de virulência de *S. enterica* (HENSEL, 2004).

Em contato com condições intestinais como baixo nível de oxigênio, alta osmolaridade, ligeira alcalinidade, ocorre a expressão dos genes da SPI-1 que ativam o T3SS-1 da *S. enterica* (BAJAJ *et al.*, 1996). O T3SS-1 transloca proteínas efetoras para o citoplasma das células epiteliais do intestino do hospedeiro. As proteínas efetoras induzem rearranjo do citoesqueleto de actina celular, com pregueamento da membrana plasmática da célula do hospedeiro, e consequente invasão da *S. enterica* para o interior de macropinosomos intracelulares (GÁLAN, 2001). *S. Typhimurium* penetra em células epiteliais intestinais e em células fagocíticas, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (SANTOS e BÄUMLER, 2004). Outrossim, o T3SS-1 é responsável por induzir a resposta inflamatória intestinal neutrofílica de *S. Typhimurium*. Proteínas efetoras codificadas pelos genes *sipA* (*sspA*), *sopA*, *sopB* (*sigD*), *sopD* e *sopE2* são componentes do T3SS-1 requeridos para invasão de células epiteliais (RAFFATELLU *et al.*, 2005a) e também para indução do influxo de neutrófilos no lúmen intestinal após infecção por *S. Typhimurium* em modelo experimental de ligadura da alças de bezerros (ZHANG *et al.*, 2002). As proteínas efetoras SopE, SopE2 e SopB de *S. Typhimurium* estimulam a resposta imune celular através da ativação de proteínas quinase ativadoras de mitose (MAPK) e da sinalização de NF- κ B, que induzem liberação de fatores pró-inflamatórios CXC, como CXCL-8 e CXCL-2 (BRUNO *et al.*, 2009). A proteína SopE media a ativação da caspase-1, que resulta na ativação das citocinas IL-1 β e IL-18

(MÜLLER *et al.*, 2009). LEE *et al.* (2000) comprovaram que mesmo extracelularmente, a proteína efetora SipA induz migração transepitelial de neutrófilos.

HERNANDEZ *et al.* (2004) demonstraram que a proteína efetora SopB media a formação dos macropinosomos no citoplasma da célula do hospedeiro através da manutenção dos níveis de defosforilação do bifosfato 4,5-fosfatidilinositol. Esta ação da SopB inibe a fusão do lisossomo ao vacúolo contendo *Salmonella* (SCV) (BAKOWSKI *et al.*, 2010). *Salmonella* no interior do SCV permanece em condição ácida do meio, o que ativa a expressão da SPI-2 e secreção de proteínas efetoras pelo T3SS-2 (COOMBES *et al.*, 2004). A SPI-2 possui fatores de virulência responsáveis pela manutenção da sobrevivência intracelular da *Salmonella*, pela manipulação do tráfego do SCV (FIGUEIRA e HOLDEN, 2012) e é responsável adicionalmente pela indução de mecanismos pró-inflamatórios durante infecção por *S. Typhimurium*. Em experimentos *in vitro* realizados por LYONS *et al.* (2004), os autores demonstraram que a SPI-2 é necessária para translocase da flagelina, fator de virulência de *S. Typhimurium* que é responsável pela ativação de TLR5 na membrana basolateral da célula do hospedeiro infectado e consequente liberação da citocina pró-inflamatória CXCL-8. HAPFELMEIER *et al.* (2005) reportaram que ambos SPI, SPI-1 e SPI-2, são necessários para indução de inflamação por *S. Typhimurium* via independente e dependente de MyD88, respectivamente, em camundongo que apresenta colite. Macrófagos e células dendríticas infectados com *S. Typhimurium* secretam IL-23 e IL-18 e ampliam a resposta inflamatória pela estimulação das células T a secretarem IL-17, IL-22 e interferon gamma (IFN γ) (GODINEZ *et al.*, 2008; GODINEZ *et al.*, 2009). KEESTRA *et al.* (2011) demonstraram que a expressão de IL-23 durante a infecção intestinal por *S. Typhimurium* depende de MyD88.

Embora a inflamação neutrofílica auxilie na prevenção da disseminação sistêmica de *S. Typhimurium* (SANTOS *et al.*, 2009), a resposta inflamatória intestinal fornece uma vantagem seletiva para *S. Typhimurium* sobre a microbiota, promovendo o maior multiplicação de *S. Typhimurium* no lúmen intestinal e aumentando a capacidade de transmissão fecal oral deste patógeno (LAWLEY *et al.*, 2008). Há diversos mecanismos que *S. Typhimurium* utiliza para desempenhar vantagem competitiva em relação à microbiota residente na colonização do intestino inflamado; quer seja pelo escape a fatores antimicrobianos secretados pelo hospedeiro no intestino, ou mesmo pela utilização metabólica de produtos gerados pelo organismo hospedeiro ou a própria microbiota intestinal durante o processo inflamatório (SANTOS, 2014).

A expressão de IL-22 induz a expressão de fatores antimicrobianos e suprime a colonização de bactérias comensais (BEHNSEN *et al.*, 2014). RAFFATELLU *et al.* (2009) demonstraram que a IL-22 induz a expressão de óxido nítrico sintetase (iNOS), da mucina MUC4 e do sideróforo lipocalina-2. A produção de lipocalina-2 no intestino do hospedeiro infectado é induzida pela ação das citocinas IL-22 (AUJLA *et al.*, 2008) e IL-17 (RAFFATELLU *et al.*, 2008). A lipocalina-2 desempenha a função de neutralização de um sideróforo ligante de ferro férrico liberado por enterobactérias denominado enterobactina (RAFFATELLU e BÄUMLER, 2010), pela ligação específica a este sideróforo, com consequente impedimento de absorção do sideróforo pela bactéria secretora (FLO *et al.*, 2004). Apesar da ação antimicrobiana desenvolvida pelo organismo hospedeiro, *S. Typhimurium* apresenta nítida multiplicação durante inflamação intestinal e consegue superar a ação da lipocalina-2, por meio de outros mecanismos que promovem a aquisição seletiva de ferro em sua forma catiônica ou quando este elemento está ligado a sideróforos (RAFFATELLU *et al.*, 2009).

Além da lipocalina-2, a calproteína é secretada por neutrófilos durante inflamação. A calproteína sequestra metais como zinco e manganês no lúmen intestinal, com a finalidade de restringir a disponibilidade de micronutrientes para utilização por enteropatógenos. *S. Typhimurium* secreta um transportador de alta afinidade ao zinco, denominado ZnuABC, que possibilita a multiplicação de *S. Typhimurium* e a vantagem competitiva sobre a microbiota intestinal em ambiente inflamado (LIU *et al.*, 2012). *S. Typhimurium* exerce adicionais vantagens competitivas frente às bactérias comensais por meio da utilização de microelementos disponíveis no intestino inflamado (SANTOS, 2014). Durante inflamação intestinal, a respiração oxidativa das células fagocíticas induz produção de radicais de oxigênio (ROS) que oxidam o tiosulfato a tetrionato, que é utilizado como aceptor de elétrons em *S. Typhimurium* (WINTER *et al.*, 2010). THIENNIMITR *et al.* (2011) demonstraram que o uso do tetrionato como receptor de elétron permite a *S. Typhimurium* a vantagem de utilização da etanolamina como fonte de nutrientes durante respiração anaeróbica no lúmen intestinal inflamado.

CAPÍTULO II

ESTUDO DE MECANISMOS UTILIZADOS POR *SALMONELLA ENTERICA* SOROTIPO TYPHIMURIUM PARA SOBREVIVER À PRIVAÇÃO DE FERRO EM MODELOS ANIMAIS²

1. INTRODUÇÃO

O ferro é essencial para o hospedeiro e o patógeno. No hospedeiro, o ferro é requerido como cofator para atividades metabólicas ou funções enzimáticas importantes e sua disponibilidade usualmente é limitada em fluidos corpóreos ou soro sanguíneo pela ação de proteínas ligantes específicas, como a transferrina e a lactoferrina, ou pelo sequestro para o interior celular pela proteína de estoque ferritina. Esta medida fisiológica é necessária, pois o ferro em sua forma livre facilita a formação de radicais livres, o que resulta em danos em proteínas, lipídeos e DNA celulares (HENTZE *et al.*, 2004).

Durante a infecção, ocorre competição por ferro entre hospedeiro e patógeno e as bactérias necessitam, de maneiras distintas, evadir a resposta antimicrobiana que promove a privação de ferro e internalizar este elemento para que consigam multiplicar efetivamente no hospedeiro. Em micro-habitat com a presença de oxigênio, o íon ferro é encontrado predominantemente sob a sua forma oxidada e insolúvel, o ferro férrico Fe^{3+} . Para internalização do ferro férrico, as enterobactérias secretam sideróforos, que são complexos proteicos de baixo peso molecular ligantes de afinidade alta ao ferro férrico (O'BRIEN e GIBSON, 1970; POLLACK e NEILANDS, 1970). A absorção do sideróforo- Fe^{3+} ocorre pela ligação deste quelante a um receptor de especificidade alta presente na membrana externa da bactéria secretora. Esse processo utiliza energia gerada por um complexo proteico TonB/ExbB/ExbD presente na membrana interna bacteriana, que possibilita a absorção do ferro ligado ao sideróforo para o espaço periplasmático bacteriano. O sideróforo- Fe^{3+} é internalizado para o citoplasma por meio de um complexo proteico de membrana interna denominado ABC transportador (CARPENTER e PAYNE, 2014). Em micro-habitat com baixa concentração de oxigênio, o ferro é encontrado predominantemente em sua forma

² O CAPÍTULO II proveio de estudo que gerou o manuscrito científico intitulado “Iron acquisition pathways and colonization of the inflamed intestine by *Salmonella enterica* Typhimurium” submetido à FEMS Microbiology Letters (Anexo B).

reduzida e solúvel, o ferro ferroso Fe^{2+} . Como mecanismo de absorção de ferro ferroso Fe^{2+} , bactérias da família Enterobacteriaceae possuem os genes *feoABC*, que codificam sistema transportador de Fe^{2+} presente na membrana interna bacteriana. Pelo fato de o Fe^{2+} ser solúvel, este elemento pode entrar no espaço periplasmático por difusão, através de porinas, assim receptores especializados na membrana externa não são necessários para sua captação (TSOLIS *et al.*, 1996).

S. Typhimurium requer o metal ferro como um nutriente essencial. Aproximadamente 7% do genoma de *S. Typhimurium* é regulado pelos níveis de ferro sob condições *in vitro* (BJARNASON *et al.*, 2003). Em camundongos infectados por *S. Typhimurium*, no entanto, observa-se menor quantidade de ferro inorgânico disponível no conteúdo fecal (DERIU *et al.*, 2013), o que evidencia a restrição de ferro livre durante infecção intestinal. Adicionalmente, a resposta inflamatória durante a infecção por *S. Typhimurium* induz a secreção da lipocalina-2 (RAFFATELLU *et al.*, 2009), proteína antimicrobiana que desempenha a função de neutralização da enterobactina (RAFFATELLU e BÄUMLER, 2010) por meio da ligação específica a este sideróforo e o consequente impedimento de absorção do sideróforo + ferro pela bactéria secretora (FLO *et al.*, 2004). A síntese da enterobactina ocorre em bactérias da família Enterobacteriaceae e é controlada pelos genes *entCEBA*, *entD* e *entF* e sua internalização para o espaço periplasmático é mediada pelo receptor de FepA da membrana externa (RAYMOND *et al.*, 2003). À semelhança de outras bactérias entéricas, *S. Typhimurium* secreta a enterobactina; no entanto, também produz um sideróforo ligante de ferro férrico denominado salmoquelina. Diferentemente da enterobactina, a salmoquelina não é inativada pela lipocalina-2 e permite assim que *S. enterica* absorva ferro durante a infecção do lúmen intestinal. A produção da salmoquelina pela *S. enterica*, ocorre mediante uma reação de glicosilação da enterobactina (MÜLLER *et al.*, 2009). O grupo de genes *iroN iroBCDE* é responsável pela biossíntese (*iroB*), exportação (*iroC*), e absorção (*iroN*) da salmoquelina. Os mecanismos de absorção de ferro férrico e ferro ferroso presentes em *S. Typhimurium* estão ilustrados na Figura 1.

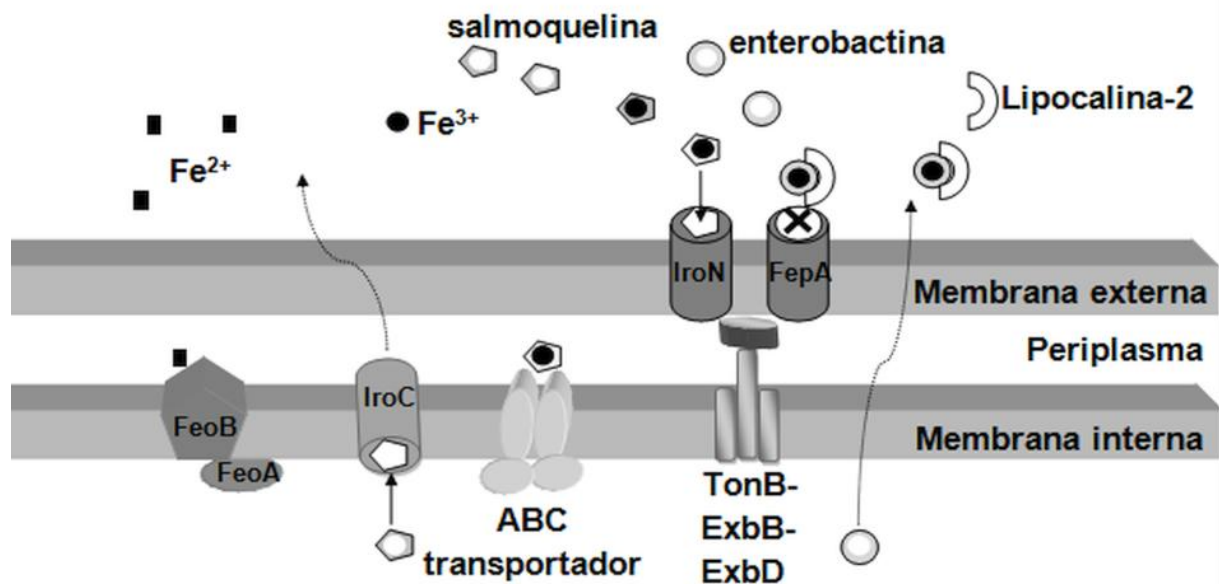


Figura 1. Mecanismos de transporte e absorção de ferro férrico e ferro ferroso pela *Salmonella Typhimurium*. Os receptores de membrana externa IroN e FepA ligam-se aos complexos salmoquelina-Fe³⁺ e enterobactina-Fe³⁺, respectivamente, e transportam o complexo sideróforo-Fe³⁺ através da membrana externa utilizando energia proveniente do complexo TonB/ExbB/ExbD. Durante processo inflamatório o hospedeiro secreta lipocalina-2, que se liga especificamente à enterobactina, impedindo a absorção do complexo enterobactina-Fe³⁺. O ferro Fe²⁺ é transportado pelo complexo FeoAB, presente na membrana interna da bactéria.

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos para avaliar os genes regulatórios da homeostasia do ferro e os genes responsáveis pela secreção de proteínas relacionadas à absorção de ferro férrico e ferro ferroso por *S. Typhimurium*. TSOLIS *et al.* (1996) demonstraram que em condições de limitação de ferro *in vitro*, mutantes de *S. Typhimurium* com deleção dos genes *entB* e *tonB* apresentam menor multiplicação que a cepa selvagem de *S. Typhimurium*; a deleção do gene *feoB*, contudo, não altera a multiplicação *in vitro* em meio com limitação de ferro (TSOLIS *et al.*, 1996). Em modelo murino tifoide, BENJAMIN *et al.* (1985) demonstraram que a mutação induzida no gene *ent* não induz diminuição de virulência bacteriana em camundongos infectados via intravascular ou via intraperitoneal. TSOLIS *et al.* (1996) demonstraram ainda que no modelo murino tifoide, em camundongos infectados via intragástrica, a deleção no gene *tonB* não promove a diminuição de virulência da cepa de *S. Typhimurium* mutante; somente a mutante de *S. Typhimurium* com deleção do gene *feoB* apresenta menor quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) por miligrama de fezes quando comparada à cepa selvagem de *S. Typhimurium* recuperada no conteúdo fecal dos animais três dias após infecção (TSOLIS *et al.*, 1996). RAFFATELLU *et al.* (2009) demonstraram que a salmoquelina é um importante fator de virulência de *S. Typhimurium*.

Em modelo murino previamente tratado com estreptomicina que apresenta colite após infecção por *S. Typhimurium*, a deleção do gene *iroN* promove menor colonização do cólon dos animais infectados quando comparada à cepa selvagem de *S. Typhimurium* quando as cepas de *S. Typhimurium*, mutante e selvagem, expressam genes pertencentes às T3SS-1 e T3SS-2, envolvidos na indução de inflamação intestinal (RAFFATELLU *et al.*, 2009).

Para completo entendimento da patogenia de *S. Typhimurium* é importante elucidar como esta bactéria é capaz de induzir inflamação e favorecer sua multiplicação, criando vantagem competitiva frente a outras enterobactérias, e quais os principais meios pelos quais *S. Typhimurium* resiste à resposta antimicrobiana induzida durante o processo inflamatório. O atual trabalho propôs o estudo dos mecanismos pelos quais *S. Typhimurium* absorve ferro em ambiente intestinal inflamado, por meio da utilização de três modelos experimentais animais de infecção: o modelo murino pré-tratado com estreptomicina, o modelo murino tratado com dextran sulfato de sódio (DSS) e o modelo de alças ilíacas de bovinos cirurgicamente ligadas. O tratamento com DSS induz inflamação química aguda ou crônica do cólon em camundongos. Os animais com inflamação aguda induzida através da administração de DSS apresentam colite ulcerativa neutrofílica, perda de peso e diarreia (OKAYASU *et al.*, 1990).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi o de avaliar o papel da aquisição de Fe^{2+} e Fe^{3+} por *S. Typhimurium* durante a fase de infecção intestinal, bem como a relação da inflamação com a aquisição deste microelemento. Os objetivos específicos foram:

- I. Determinar a participação dos genes *feoB*, *tonB* e *iroN* na colonização intestinal de *S. Typhimurium* em camundongos pré-tratados com estreptomicina e em alças ilíacas de bezerros cirurgicamente ligadas.
- II. Verificar a interferência da inflamação induzida pelo T3SS-1 de *S. Typhimurium* sobre a colonização intestinal de mutantes *tonB feoB*, *feoB, tonB* e *iroN* de *S. Typhimurium* em camundongos pré-tratados com estreptomicina e em alças ilíacas de bezerros cirurgicamente ligadas.
- III. Verificar a interferência da inflamação química induzida previamente à infecção por *S. Typhimurium* sobre a colonização intestinal de mutantes *tonB feoB*, *feoB, tonB* e *iroN* de *S. Typhimurium* em camundongos tratados com DSS a 3%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob os números de protocolos 197/2008, 254/2012 e 386/2013.

3.2 CEPAS DE BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

As cepas de *S. Typhimurium* utilizadas no presente estudo estão listadas na Tabela 2. A cepa IR715 é naturalmente resistente ao ácido nalidíxico e derivada da cepa selvagem *S. Typhimurium* ATCC 14028. A inserção de um cassete de resistência à canamicina no gene *phoN* da cepa IR715 gerou a cepa AJB715, nomeada no estudo como a cepa de referência de *S. Typhimurium*. A cepa mutantes *invA feoB* (SW710), *invA tonB* (SW711), e *invA tonB feoB* (SW712) foram construídas por introdução de mutação *invA::pGP704* da cepa SW399 nas ,105) (SCHMIEGER, 1972). As cepas foram cedidas pelo *Department Medical Microbiology and Immunology da University of California at Davis*. A confirmação da mutação das cepas *invA feoB* (SW710), *invA tonB* (SW711), e *invA tonB feoB* (SW712) foi realizada por PCR e os iniciadores utilizados para estão listados na Tabela 3.

Os meios de cultivo microbiológico utilizados nos experimentos foram o meio nutriente (3g extrato de carne, 5g peptona, 5g NaCl por litro), meio Luria Bertani (10g triptona, 5g extrato de levedura, 5g NaCl por litro), e LB ágar (10g triptona, 5g extrato de levedura, 5g NaCl, 13g ágar bacteriológico por litro). Quando apropriado, foram adicionados os antimicrobianos nos meio de cultivo microbiológico nas seguintes concentrações: ácido nalidíxico a 50 mg/L, tetraciclina a 12,5 mg/L, canamicina a 100 mg/L, e ampicilina a 100 mg/L.

Para avaliar a multiplicação das mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* e *iroN in vitro* em meio com limitação de ferro disponível, as cepas selvagem e mutantes de *S. Typhimurium* foram cultivadas por 12 a 16 horas em meio NB acrescido do antimicrobiano ao qual a cepa cultivada possuía resistência e 0,2 mM 2-2´dipyridyl (Sigma Aldrich, EUA) e a multiplicação microbiana foi mensurada por densidade óptica (OD) a 600 nm em espectrofotômetro (Biorad, EUA). As cepa de referência de *S. Typhimurium* (ref.) e mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* e *iroN* de *S. Typhimurium* foram inoculadas quando apresentaram valor de absorvância

de 0,01 em meio NB puro, meio NB suplementado com 40 μM FeSO_4 , 40 μM FeCl_3 ou 0,2 mM dipiridyl e foi realizada mensuração de $\text{OD}_{600\text{nm}}$ após 24 horas.

Para inoculação nos camundongos pré-tratados com estreptomicina, camundongos tratados com DSS e das alças de íleo de bezerros cirurgicamente ligadas, as bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) com a adição dos antimicrobianos apropriados em ambiente aeróbico por 18 a 20 horas a 37°C sob agitação (200 rpm). Após o período, os pré-inóculos foram diluídos em proporção 1:50 em meio LB (sem antimicrobiano) e incubados por 3 horas a 37°C sob agitação. A concentração da bactéria foi medida por densitometria óptica a 600 nm para inoculação dos animais.

3.3 MODELO MURINO PRÉ-TRATADO COM ESTREPTOMICINA

Camundongos C57Bl/6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idades foram previamente tratadas intragastricamente, via gavagem, com estreptomicina (200 mg/ μL) 24 horas antes da inoculação, conforme descrito por BARTHEL *et al.* (2003). Após 24 horas, os animais coinfetados, na proporção de 1:1, com 0,1 mL de LB contendo em cada mistura 1×10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. Typhimurium* IR715 *phoN* (AJB715) e uma das seguintes cepas mutantes: *tonB feoB* (AJB62), *feoB* (AJB15), *tonB* (AJB36), ou *iroN* (AJB52). Outro grupo de camundongos foi coinfetado, sob as mesmas condições, na proporção de 1:1, com 0,1 mL de LB contendo em cada mistura 1×10^7 UFC da mutante de *S. Typhimurium phoN invA* (TH199) e uma das seguintes cepas mutantes: *invA tonB feoB* (SW712), *invA feoB* (SW710), *invA tonB* (SW711), ou *invA iroN* (SPN454). Os animais foram submetidos à eutanásia 48 e 96 hpi, com a eutanásia aplicada por sobredose de quetamina, xilazina via intraperitoneal (9 mg de quetamina e 0,2 mg de xilazina) e deslocamento cervical e foram coletadas as amostras de pellet fecal e ceco para cultivo microbiológico, histopatologia e RT-PCR quantitativo (qRT-PCR). Amostras de fezes foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) e plaqueadas em LB ágar contendo ácido nalidíxico e em ágar LB contendo ácido nalidíxico com a adição do antimicrobiano ao qual a respectiva mutante possui resistência. O índice de competitividade foi obtido pela divisão do número de colônias recuperadas nos tecidos dos animais infectados (número de UFC da cepa de referência/número de UFC da cepa mutante) pelo número de colônias inoculadas nos animais (número de UFC da cepa de referência/número de UFC da cepa mutante). Amostras de ceco foram coletadas para histopatologia e qRT-PCR.

Tabela 2. Cepas de *Salmonella Typhimurium* utilizadas

Cepa	Genótipo	Referência
AJB15	IR715 <i>feoB</i> ::Tet ^R	TSOLIS <i>et al.</i> , 1996
AJB36	IR715 <i>tonB</i> ::Kan ^R	TSOLIS <i>et al.</i> , 1996
AJB52	IR715 <i>iroN</i> ::pGP704-Amp ^R	BÄUMLER <i>et al.</i> , 1998b
AJB62	IR715 <i>feoB</i> ::Tet ^R <i>tonB</i> ::Kan ^R	TSOLIS <i>et al.</i> , 1996
AJB715	IR715 <i>phoN</i> ::Kan ^R	KINGSLEY <i>et al.</i> , 2003
IR715	ATCC 14028 Nal ^R	STOJILJKOVIC <i>et al.</i> , 1995
SPN452	IR715 <i>invA</i> :: <i>tetRA</i> <i>spiB</i> ::KSAC-Kan ^R	RAFFATELLU <i>et al.</i> , 2009
SPN454	IR715 <i>invA</i> :: <i>tetRA</i> <i>spiB</i> ::KSAC-Kan ^R <i>iroN</i> ::pGP704-Amp ^R	RAFFATELLU <i>et al.</i> , 2009
SW399	IR715 <i>invA</i> ::pGP704	WINTER <i>et al.</i> , 2009a
SW710	IR715 <i>invA</i> ::pGP704 <i>feoB</i> ::Tet ^R	Neste estudo
SW711	IR715 <i>invA</i> ::pGP704 <i>tonB</i> ::Kan ^R	Neste estudo
SW712	IR715 <i>invA</i> ::pGP704 <i>feoB</i> ::Tet ^R Δ <i>tonB</i> ::Kan ^R	Neste estudo
TH199	IR715 <i>phoN</i> ::Kan ^R <i>invA</i> :: <i>tetRA</i>	WINTER <i>et al.</i> , 2014

^aTet^R: resistente à tetraciclina (*tetRA*); Kan^R: resistente à canamicina; Amp^R: resistente à ampicilina; Nal^R: resistente a ácido nalidíxico.

Tabela 3. Sequência de iniciadores utilizados em PCR convencional para confirmação de mutagênese em cepas *invA tonB feoB*, *invA feoB* e *invA tonB* de *Salmonella Typhimurium*

Iniciadores	Alvo	Sequência (5'-3')	Produto (Kb)
invA Fw	SW399	142 ATTACCACGCTCTTTCGTCTG	cepa selvagem: neg. ^a 0.5-0.6
invA Rev		50 GCATTTATCAGGGTTATTGTCTC	
feoB Fw	SW710	740TACATCCAGTTAGTAAGAAACAAGTAG	cepa selvagem: 3 mut ^b : 5 (3+2 Tet)
feoB Rev	SW712	741 GGTAACGCTTTCATCTTTGTGG	
tonB Fw	SW711	738 CGCTGTTTATTTATGTTGCCGTCG	cepa selvagem: 0.9 mut.: 2.2 (0.9 +1.3 Kan)
tonB Rev	SW712	739 CCAATGCCTTATTGAATATGATTGC	

^aneg= Negativo na cepa selvagem de *S. Typhimurium*. ^bmut= mutante

3.4 MODELO MURINO TRATADO COM DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO (DSS)

Camundongos C57Bl/6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idades receberam administração oral *ad libitum* de DSS (Affymetrix, EUA) a 3% diluído em água destilada estéril, fornecido no bebedouro dos animais. Após 120 horas de tratamento com DSS, os animais foram submetidos a 4 horas de jejum hídrico e alimentar, após o qual os animais foram inoculados, na proporção de 1:1, com 0,1 mL de LB contendo 1×10^7 UFC de *S. Typhimurium* IR715 *phoN* (AJB715) e uma das seguintes cepas mutantes: *tonB feoB* (AJB62), *feoB* (AJB15), *tonB* (AJB36), ou *iroN* (AJB52). O fornecimento de DSS em bebedouro foi mantido até a eutanásia dos animais. Após 48 horas de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de quetamina, xilazina inoculados via intraperitoneal (9 mg de quetamina e 0,2 mg de xilazina) e deslocamento cervical. Foi realizada necropsia e foram coletadas as amostras de ceco e cólon para cultivo microbiológico e histopatologia.

3.5 MODELO DE ALÇAS ILÍACAS DE BEZERROS CIRURGICAMENTE LIGADAS

Quatro bezerros machos de quatro semanas de idade foram submetidos à cirurgia conforme descrito por SANTOS *et al.*, (2002a) no centro cirúrgico de grandes animais da Escola de Veterinária da UFMG. Até o momento da cirurgia os animais foram mantidos em ambiente sem o contato com animais da mesma espécie e de outras espécies, e alimentados duas vezes ao dia com leite e água *ad libitum*. Os animais foram examinados e diagnosticados livres de *Salmonella* spp, por obterem resultado negativo em swabs de fezes cultivados em meio enriquecido de tetracionato (Difco, EUA) e estriamento em ágar base XLT4 (Difco, EUA).

Os animais permaneceram em jejum por 24 horas antes da cirurgia de ligação das alças ilíacas. Durante cirurgia e inoculação, a anestesia foi induzida com propofol, seguida de intubação endotraqueal e manutenção da anestesia com isoflurano, segundo descrito por SANTOS *et al.* (2001b). Foi realizada uma laparotomia, com exposição das alças ilíacas e ligadura de alças ilíacas com uma média de 4 cm de comprimento e 1 cm de espaço entre elas. As alça ilíaca ligada foi inoculada com injeção intraluminal de 3 mL de meio LB na proporção de 1:1 1×10^9 UFC da cepa de referência *phoN* (AJB715), e uma das seguintes mutantes: *tonB feoB* (AJB62), *feoB* (AJB15), *tonB* (AJB36), ou *iroN* (AJB52). As demais alças ilíacas ligadas foram inoculadas sob as mesmas condições na proporção de 1:1 com a mutante *phoN invA* (TH199), e uma das seguintes mutantes: *invA tonB feoB* (SW712), *invA feoB* (SW710), *invA tonB* (SW711), ou *invA iroN* (SPN454). As alças intestinais foram recolocadas dentro da cavidade abdominal dos animais até o momento da coleta das amostras. Os animais foram submetidos à eutanásia 8 hpi com sobredose de anestesia inalatória. As amostras foram coletadas para isolamento bacteriano e histopatologia. O fluido intestinal e fragmentos ilíacos removidos por *punchs* de biópsia de 6 mm foram homogeneizados em 2 mL de PBS estéril e a solução obtida foi plaqueada em ágar LB contendo ácido nalidixíco e em placa contendo ácido nalidixíco acrescido do antibiótico apropriado para multiplicação das cepas mutantes.

3.6 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E RT-PCR QUANTITATIVO

Fragmentos de ceco dos camundongos pré-tratados com estreptomicina e infectados durante 48 horas foram armazenados em criotubos e conservados a -80°C . Resumidamente, os cecos dos animais infectados foram ressuspensos em 1 mL do reagente *Tri* (Tri-reagent, Sigma Aldrich, EUA), homogeneizados e incubados no gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente

por 15 minutos, após o qual foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 12.000 x g. A fase aquosa foi transferida para novo tubo com 0,5 mL de isopropanol, incubada durante 10 minutos, e submetida a seguir à centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, lavagem do sedimento com 1 mL de etanol 75% e secagem. O RNA foi ressuscitado em 30 µL de água livre de RNase. Para a confecção do DNA complementar (cDNA), a transcrição reversa foi realizada utilizando 5 µL de RNA (a 500 ng/µL) e reagentes do kit TaqMan (Applied Biosystems, EUA), sendo submetido ao ciclo de 25°C por 10 minutos, 48°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos. Foram utilizados 2,5 µL de cDNA para cada reação de PCR em tempo real, com volume total de 25 µL. Para a reação, foram utilizados 12,5 µL de SYBR-Green (Applied Biosystems, EUA), 8 µL de água ultrapura e 1 µL de cada iniciador a 10 µM (Tabela 4). Níveis de transcrição de *cxcl-2*, *cxcl-1* e *lipocalina-2* foram analisados. O nível de transcrição das amostras foram normalizados com base em valores do transcrito pelo gene *gapdh* e os dados de qRT-PCR foram analisados pelo método comparativo de Delta-Ct (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 4. Iniciadores usados para PCR em Tempo Real quantitativa (qRT-PCR)

Gene	Sequências dos Iniciadores	Referência
<i>cxcl-2</i>	AGTGA ACTGCGCTGTCAATGC AGGCAA ACTTTTTGACCGCC	PAIXÃO <i>et al.</i> , 2009
<i>cxcl-1</i>	TGCACCCAAACCGAAGTCAT TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC	PAIXÃO <i>et al.</i> , 2009
<i>lipocalina-2</i>	ACATTTGTTCCAAGCTCCAGGGC CATGGCGAACTGGTTGTAGTCCG	DERIU <i>et al.</i> , 2013
<i>gapdh</i>	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	PAIXÃO <i>et al.</i> , 2009

3.7 HISTOPATOLOGIA

Fragmentos de ceco e cólon foram fixados em formalina 10%, incluídos em parafina, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e embebidos pela parafina. Os blocos de parafina contendo o tecido fixado foram cortados em micrótomo e geraram lâminas histológicas com a espessura de 5 µm que foram destinadas à coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Os cortes histológicos foram analisados quanto às

alterações inflamatórias nos seguintes escores: 0 – ausência de lesão; 1 – lesão discreta; 2 – lesão moderada e 3- lesão intensa.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados de UFC e transcrição de RNA mensageiros medidos por qRT-PCR foram transformados logaritmicamente e analisados por ANOVA seguida do teste t de Student. Os escores histopatológicos foram analisados pelo teste de Mann Whitney (GraphPad InStat3, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONFIRMAÇÃO DO GENÓTIPO DAS MUTANTES *INV A TONB FEOB*, *INV A FEOB* E *INV A IRON* PROVENIENTES DA CEPA DE REFERÊNCIA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Para confirmar a deleção do gene *invA* nas mutantes *invA tonB feoB* (SW712), *invA feoB* (SW710) e *invA tonB* (SW711), foi realizada a PCR convencional e os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose. A sequência de codificação de *tonB* e *feoB* foi interrompida pela inserção de um cassete de resistência a canamicina (Kan^R) ou tetraciclina (Tet^R). O gene *invA* foi interrompido por inserção de um derivado de pGP704 nas mutantes *tonB feoB*, *feoB* e *tonB* (Figura 2).

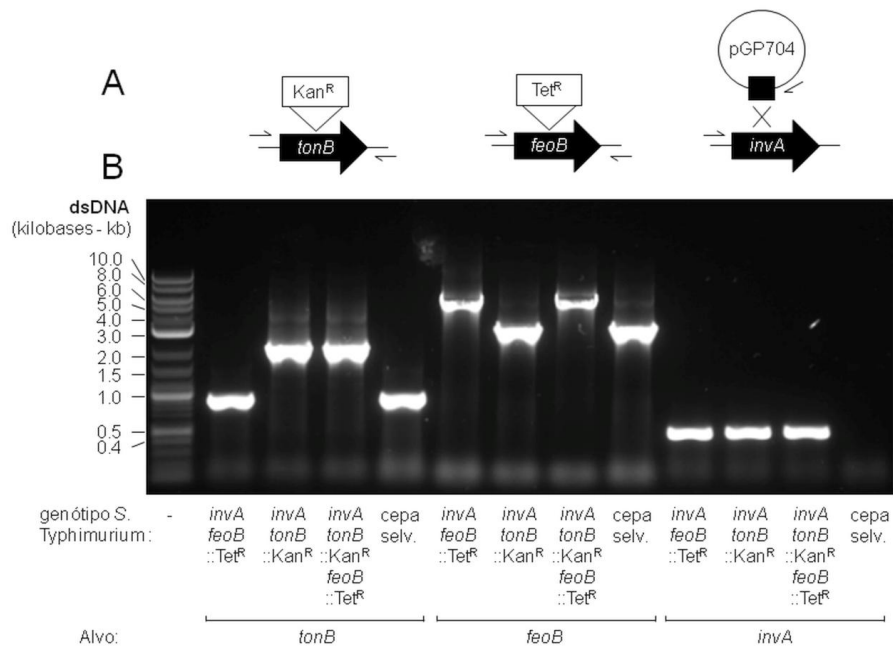


Figura 2. Confirmação dos mutantes de *Salmonella Typhimurium* por PCR. (A) Representação esquemática dos genes alvo e abordagem de mutagênese. A sequência de codificação de *tonB* e *feoB* foi interrompida com a inserção de um cassete de resistência a canamicina (Kan^R) ou tetraciclina (Tet^R). O gene *invA* foi interrompido pela inserção de um derivado de pGP704. A localização aproximada dos sítios de ligação de iniciadores é indicada pela meia-seta. (B) As cepas mutantes de *S. Typhimurium* indicadas serviram como amostras para a amplificação dos vários genes alvos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose. Marcadores de tamanho aproximado são indicados no lado esquerdo do painel.

4.2 MULTIPLICAÇÃO DE MUTANTES *TONB FEOB*, *FEOB*, *TONB* E *IRON IN VITRO*

O presente estudo avaliou os mecanismos de absorção de Fe²⁺ por *S. Typhimurium*, mediado pelo sistema Feo de transporte de ferro na membrana interna, e os mecanismos de absorção de Fe³⁺ mediados pela proteína TonB e pela proteína IroN transportadora do sideróforo salmoquelina. Os efeitos das mutações nos genes *feoB*, *tonB*, *iroN*, ou da dupla mutação em *tonB* e *feoB*, sobre a multiplicação das cepas de *S. Typhimurium* foram avaliados inicialmente *in vitro*. A cepa de referência de *S. Typhimurium* e as mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* e *iroN* foram cultivadas durante 16 horas aerobicamente em meio com restrição de ferro, pela adição de 0,2 mM dipiridyl (quelante de ferro ferroso) em meio NB. A seguir, as cepas de referência e mutantes de *S. Typhimurium* foram cultivadas em NB puro, ou NB suplementado com FeSO₄, FeCl₃ ou de dipiridyl e foi realizada a leitura da densidade óptica (OD 600 nm) dos cultivos bacterianos por espectrofotômetro 24 horas após inoculação (Figura 3).

A cepa de referência de *S. Typhimurium* apresentou multiplicação similar quando cultivada em meio NB ou em meio com suplementação de ferro FeSO₄, e FeCl₃. Em meio com depleção de ferro ferroso (adição de dipiridyl), a cepa de referência demonstrou menor multiplicação quando comparado a multiplicação nos meios ricos em ferro. Somente a cepa com dupla mutação dos genes *tonB* e *feoB* demonstrou menor multiplicação em meio NB quando comparado ao obtido pela mutante *tonB feoB* nos meios suplementados com FeSO₄, e FeCl₃. Assim como a cepa de referência, as mutantes *feoB*, *tonB* e *iroN* demonstraram multiplicação similar quando cultivadas em meio NB ou nos meios com adição de FeSO₄ ou FeCl₃ e menor multiplicação em meio com a queilação de ferro ferroso. A menor multiplicação no meio com depleção de ferro foi observado nos cultivos de *tonB feoB* e *tonB*.

A cepa de referência e as mutantes apresentaram diminuição da multiplicação em meio com depleção de ferro ferroso, o que indica que a absorção de ferro por *S. Typhimurium* é fator importante para multiplicação bacteriana *in vitro*. O ferro férrico é absorvido por bactérias Gram-negativas através da síntese e secreção de sideróforos (O'BRIEN e GIBSON, 1970; POLLACK e NEILANDS, 1970). A mutante *tonB* e o duplo mutante *tonB feoB* apresentaram menor multiplicação em meio com depleção de ferro ferroso, quando comparadas as demais cepas de *S. Typhimurium*. Estes resultados demonstram que a absorção de ferro férrico mediada por TonB é necessária para multiplicação *in vitro*. Os dados estão de acordo com os obtidos por TSOLIS *et al.* (1996), que indicaram que em condições de limitação de ferro ferroso *in vitro*, a mutante de *S. Typhimurium* com deleção do gene *tonB* apresenta menor multiplicação que a cepa selvagem de *S. Typhimurium*; enquanto a deleção do gene *feoB*, promove multiplicação *in vitro* similar a cepa selvagem em meio com limitação de ferro (TSOLIS *et al.*, 1996).

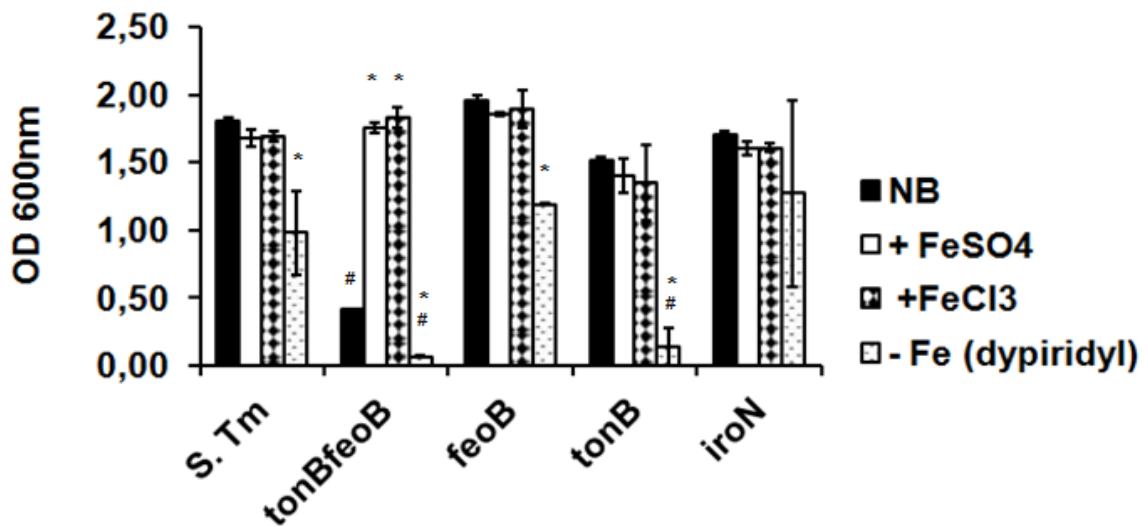


Figura 3. Multiplicação das cepas de *Salmonella Typhimurium* em meio rico em ferro e em meio com limitação de ferro disponível. As cepas de referência de *S. Typhimurium* (S.Tm) e mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* e *iroN* de *S. Typhimurium* foram inoculadas com valor de absorbância inicial de 0,01 em meio nutriente puro (NB), meio NB suplementado com de FeSO₄ 40 µM (+FeSO₄), FeCl₃ 40 µM (+FeCl₃) ou dipyridyl 0,2 mM (-Fe [dipyridyl]) e realizada mensuração de OD600 nm após 24 horas. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * indica diferença estatística comparada a mesma cepa em meio NB, teste de Tukey, * P<0,001. # indica diferença estatística entre cepas mutantes comparadas à cepa de referência nos mesmos tratamentos, teste de Tukey, # P<0,001.

4.3 COLONIZAÇÃO INTESTINAL DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM E MUTANTES *TONB FEOB*, *FEOB*, *TONB*, OU *IRON*, OU CEPA MUTANTE DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM *INVA* E MUTANTES *INVA TONB FEOB*, *INVA FEOB*, *INVA TONB* OU *INVA IRON* EM CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM ESTREPTOMICINA

Para determinar como a inflamação intestinal afeta a obtenção de ferro Fe²⁺ e Fe³⁺ por *S. Typhimurium* foi utilizado o modelo de infecção murino pré-tratado com estreptomicina. Os camundongos utilizados neste experimento foram pré-tratados com estreptomicina 24 horas antes da infecção e coinfetados via intragástrica com mistura 1:1 de *S. Typhimurium* de referência e uma das cepas mutantes: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iron*.

BARTHEL *et al.* (2003) demonstraram que camundongos pré-tratados com estreptomicina e infectados com *S. Typhimurium* desenvolvem inflamação neutrofílica aguda em ceco. A inflamação intestinal observada no modelo murino pré-tratado com estreptomicina é dependente do T3SS-1 de *S. Typhimurium* (BARTHEL *et al.*, 2003). Para investigar os mecanismos de obtenção de ferro Fe²⁺ e Fe³⁺ necessários para *S. Typhimurium* multiplicar-se

no intestino inflamado, foi avaliada a multiplicação da cepa de referência de *S. Typhimurium* em relação a multiplicação das cepas mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*. Para avaliar a dependência da inflamação sobre a absorção de ferro no intestino, o experimento de coinfeção com cepas de referência e mutantes de *S. Typhimurium* foi comparado com o de coinfeção utilizando cepas com deleção do gene *invA*. A coinfeção foi realizada em camundongos pré-tratados com estreptomicina 24 horas antes da infecção e infectados intragastricamente com meio LB estéril (controle negativo) ou com mistura 1:1 da cepa mutante *invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB*, ou *invA iroN*. A mutante *invA* não tem o T3SS-1 funcional (RAFFATELLU *et al.*, 2009), pois a *invA* é um componente da membrana interna do Sistema de Secreção Tipo III associado à invasão (T3SS-1) da *Salmonella*, que é responsável pela regulação da translocação de proteínas bacterianas associadas à inflamação.

Como esperado (BARTHEL *et al.*, 2003), os camundongos pré-tratados com estreptomicina e coinfectados com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* ou *iroN* desenvolveram inflamação cecal 48 hpi (Figura 4A e 4B). Microscopicamente, observou-se infiltrado inflamatório neutrofílico intenso na mucosa e submucosa, edema de submucosa intenso, diminuição do número de células caliciformes, e ulceração multifocal da mucosa (Figura 4B). Os animais coinfectados com as cepas *invA* e *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN* apresentaram lesões inflamatórias menos proeminentes no ceco 48 hpi (Figura 4C). Na análise histopatológica das amostras de ceco obtidas 48 hpi foram classificados os escores para o infiltrado inflamatório na mucosa, infiltrado inflamatório na submucosa, e edema de submucosa. Os escores histopatológicos observados nas amostras de ceco de animais infectados com a cepa de referência e as cepas mutantes *tonB* e *iroN* foram significativamente maiores que os encontrados nas amostras coinfectadas com a cepa *invA* e *invA tonB* ou *invA iroN* (Figura 4A). Adicionalmente, a inflamação nos fragmentos de ceco dos camundongos pré-tratados com estreptomicina e infectados foi avaliada pela mensuração dos níveis de transcrição dos genes *cxcl-2*, *cxcl-1* e *lipocalina-2* por RT-PCR quantitativo às 48 hpi (Figura 5). A expressão de *cxcl-2* foi significativamente maior em amostras coinfectadas com cepa de referência e *feoB*, e cepa referência e *iroN* em relação às mutantes com deleção do gene *invA* (Figura 5A). A transcrição dos genes *cxcl-1* e *lipocalina-2* foram maiores em amostras cecais coinfectadas com cepa de referência e *tonB feoB* e com a cepa de referência e *iroN* (Figura 5B e 5C).

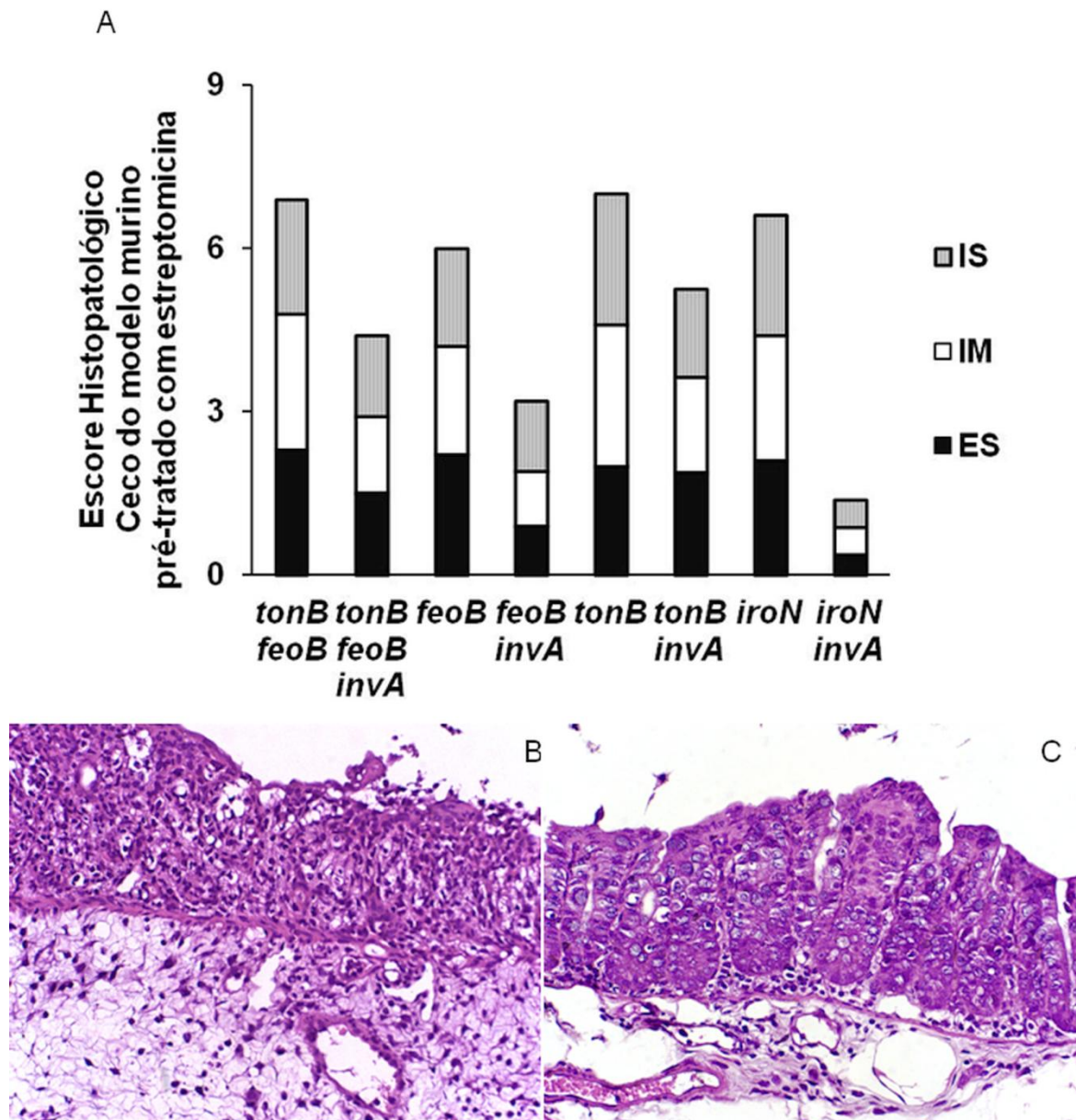


Figura 4. Inflamação intestinal em camundongos pré-tratados com estreptomicina e coinfetados com cepa referência e mutante de *Salmonella* Typhimurium. Camundongos C57Bl/6 foram coinfetados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou foram coinfetados com a cepa mutante de *S. Typhimurium* *invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN*. (A) Escore histopatológico do ceco 48 hpi. As barras representam a média do escore histopatológico para inflamação de submucosa (IS), inflamação de mucosa (IM) e edema de submucosa (ES) de cinco camundongos por grupo. (B-C) Histopatologia de fragmentos de ceco coletados 48 hpi de camundongos coinfetados com a cepa de referência e a mutante *iroN* de *S. Typhimurium* (B) ou com a *invA* e a mutante *invA iroN* de *S. Typhimurium* (C) corados por hematoxilina-eosina, 400x. * $P < 0,05$.

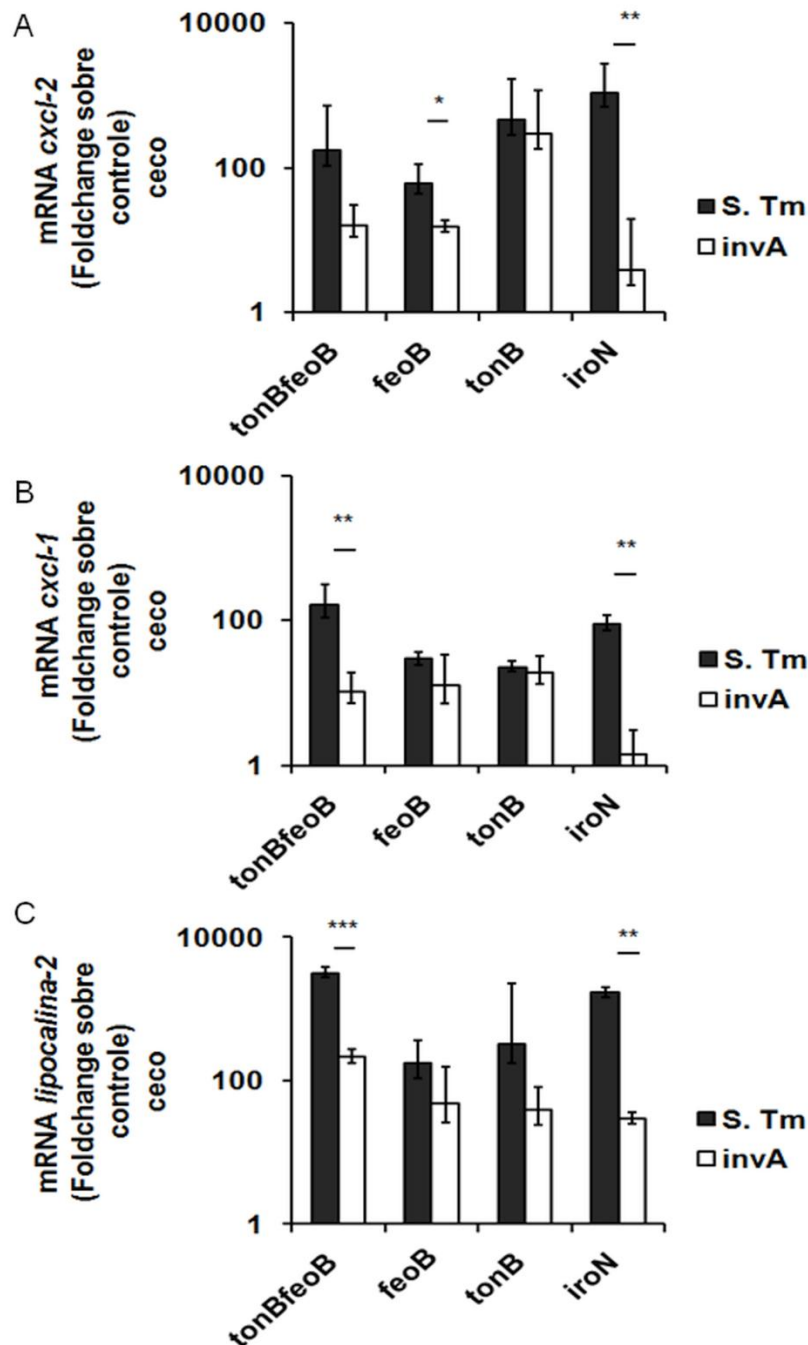


Figura 5. Quantificação de RNA mensageiro de ceco de camundongos pré-tratados com estreptomicina e coinfetados com a cepa de referência e mutante de *Salmonella Typhimurium*. Camundongos C57Bl/6 foram coinfetados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iron* (*S. Tm*), ou foram coinfetados com a cepa mutante de *S. Typhimurium invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iron* (*invA*). (A-C) Transcrição de *cxcl-2* (A) *cxcl-1* (B) e *lipocalina-2* (C) em amostras de ceco 48 após infecção, medida por RT-PCR quantitativo. Os dados representam a média geométrica e erro padrão da variação de expressão (*fold change*) normalizada pela quantidade de transcrito de *gapdh* de cinco camundongos por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Para avaliar a capacidade das mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* e *iroN* em competir com a cepa de referência de *S. Typhimurium* foi avaliado o índice de competitividade em amostras de fezes e ceco provenientes dos camundongos pré-tratados com estreptomicina e infectados 48 e 96 hpi, respectivamente. O índice de competitividade corresponde à razão entre as quantidades recuperadas de duas cepas utilizadas em experimento de coinfeção normalizadas pelos respectivos valores de UFC inoculadas (SEGURA *et al.*, 2004). Observou-se que a mutação no gene *feoB* induziu menor colonização intestinal, posto que cepa de referência de *S. Typhimurium* apresentou multiplicação 33 vezes maior que a mutante *feoB* em amostra de pellet fecal coletado 48 hpi (Figura 6A), e nove vezes maior em amostra cecal obtida 96 hpi (Figura 6B). Durante coinfeção de cepa mutante *invA* e *invA feoB*, a recuperação de *invA* foi 21 vezes maior que *invA feoB* em amostras de pellet fecal (Figura 6A), e sete vezes maior em amostras de ceco (Figura 6B). Não houve diferença significativa entre os grupos infectados com cepas com potencial inflamatório (cepa de referência e *feoB*) dos com redução de inflamação (*invA* e *invA feoB*), sugerindo que o mecanismo de absorção de Fe^{2+} por meio da FeoB não é influenciado por inflamação intestinal, sendo requisito para multiplicação de *S. Typhimurium* em condições inflamatórias e não inflamatórias. Nossos resultados coincidem com os obtidos em camundongos intragastricamente infectados por *S. Typhimurium* que não receberam o prévio tratamento com estreptomicina, os quais demonstraram que a mutação no gene *feoB* induz menor recuperação de *S. Typhimurium* 3 e 4 dias pós-infecção (TSOLIS *et al.*, 1996).

Entre os grupos infectados com cepas com potencial inflamatório (cepa de referência e *tonB feoB*, *tonB* ou *iroN*), a cepa de referência demonstrou vantagem competitiva sobre as cepas mutantes *tonB feoB*, *tonB* e *iroN*. Em amostras de pellet fecais a cepa de referência apresentou multiplicação 361, quatro e quatro vezes maior que as cepas mutantes *tonB feoB*, *tonB* e *iroN*, respectivamente (Figura 6A), e em amostras de ceco a multiplicação da cepa de referência foi seis, três e duas vezes maior que as mutantes *tonB feoB*, *tonB* e *iroN* (Figura 6B). Nos grupos infectados com as cepas mutantes com redução de inflamação (*invA* e *invA tonB feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN*), no entanto, a vantagem competitiva da *invA* sobre as mutantes *invA tonB feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN* apresentou-se diminuída ou ausente. Em fezes coletadas às 48 hpi, a razão entre a multiplicação de *invA* sobre a multiplicação de *invA tonB feoB*, *invA tonB* e *invA iroN* foi sete, 0,6 e 0,4, respectivamente (Figura 6A). Em amostras de ceco coletadas, este índice de competitividade da *invA* sobre as mutantes *invA tonB feoB*, *invA tonB* e *invA iroN* foi 1, 1 e 0,2, respectivamente (Figura 6B). Uma vez que tanto o gene *tonB* quanto o

iroN são necessários para a absorção de Fe^{3+} mediada pelo sideróforo salmoquelina, os resultados obtidos demonstrando que os genes *tonB* e *iroN* são requeridos para multiplicação de *S. Typhimurium* no intestino e dependentes da inflamação estão em concordância com um estudo anterior desenvolvido por RAFFATELLU *et al.* (2009). Em amostras de fezes de camundongos não tratados com estreptomicina e intragastricamente infectados, a mutação em *tonB* induz discreta alteração no número de bactérias recuperadas em comparação com a cepa selvagem de *S. Typhimurium* (TSOLIS *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que *S. Typhimurium* utiliza ferro ferroso e férrico para sua multiplicação, e que esta vantagem competitiva adquirida por *S. Typhimurium* é mais proeminente em meio inflamado do que em meio não inflamado.

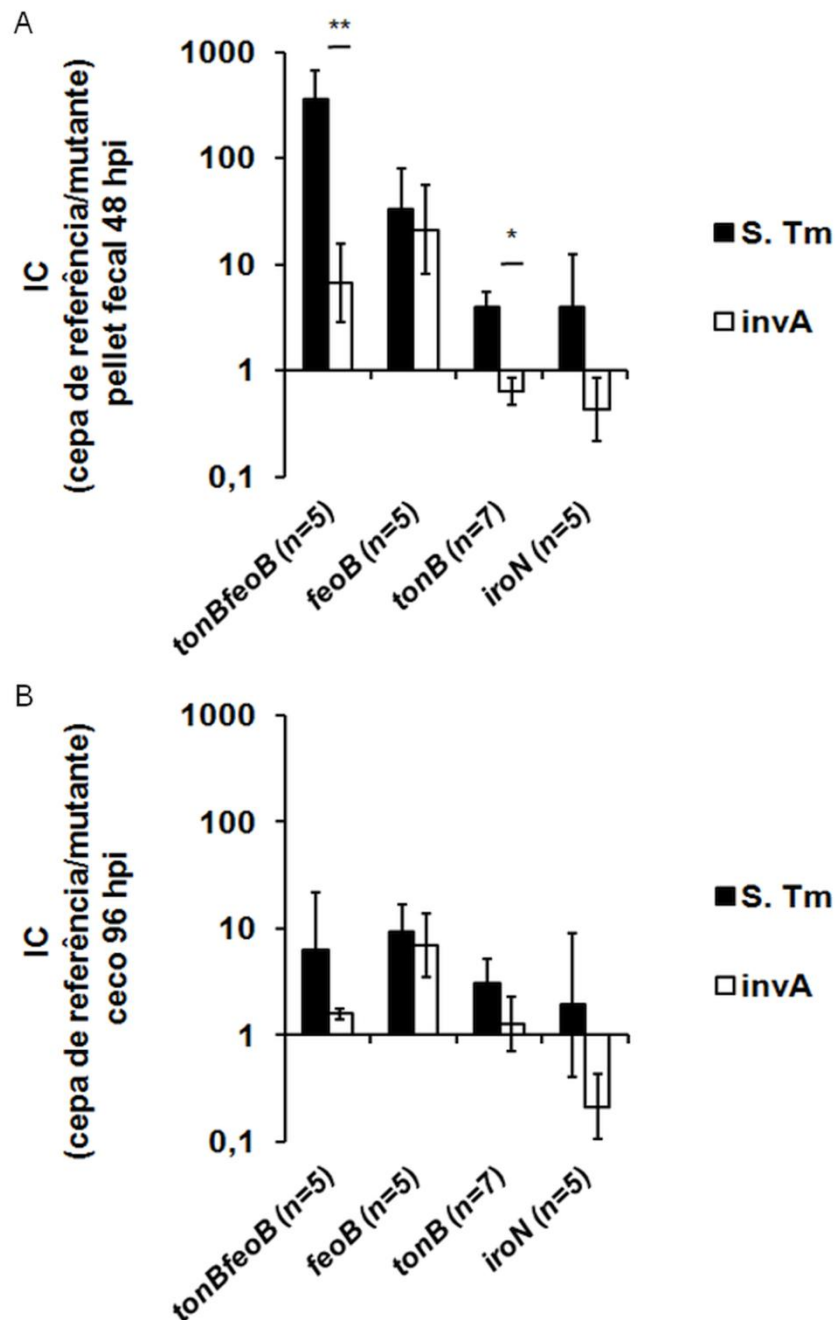


Figura 6. Colonização intestinal de camundongos pré-tratados com estreptomicina e coinfetados com a cepa de referência e mutante de *Salmonella Typhimurium*. Camundongos C57Bl/6 foram coinfetados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC da cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*, ou foram coinfetados com a cepa mutante de *S. Typhimurium* *invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN*. Amostras de fezes coletadas 48 horas após a infecção (A) e amostras de ceco coletadas 96 horas após a infecção (B) para contagem bacteriana. Os dados estão expressos em média e erro padrão do índice de competitividade (IC) das cepas de referência de *S. Typhimurium* sobre mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN* (*S. Tm*) e do índice de competitividade (IC) das cepas mutante *invA* de *S. Typhimurium* sobre mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN* (*invA*) normalizados pela razão dos respectivos inóculos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.4 COLONIZAÇÃO INTESTINAL DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM E MUTANTES *TONB* *FEOB*, *FEOB*, *TONB* E *IRON* EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM DSS

O tratamento com estreptomicina induz alterações na composição da microbiota intestinal (disbiose), com decréscimo da diversidade de bactérias presentes no ceco e íleo dos camundongos infectados por *S. Typhimurium* (GARNER *et al.*, 2009). Além disso, os camundongos tratados com estreptomicina desenvolvem inflamação cecal discreta mesmo na ausência da infecção por *S. Typhimurium* (SPEES *et al.*, 2013). A fim de salientar o papel geral da inflamação sobre os mecanismos de absorção de ferro no intestino, foram realizadas coinfeções entre *S. Typhimurium* e as cepas mutantes em camundongos com inflamação intestinal aguda quimicamente induzida, para padronização da infecção em um modelo de colite provocada pelo tratamento com DSS.

Os camundongos foram tratados com DSS a 3% durante 120 horas, seguido de inoculação na proporção de 1:1 com 0,1 mL de LB contendo 1×10^7 UFC de *S. Typhimurium* e uma das seguintes mutantes: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* ou *iroN*. Os camundongos tratados com DSS desenvolveram alterações inflamatórias no ceco (Figura 7A) e cólon (Figura 7B) caracterizadas histologicamente por infiltrado neutrofílico e linfo-histio-plasmocitário na mucosa e submucosa, edema moderado a intenso de submucosa, e ulceração multifocal intensa da mucosa.

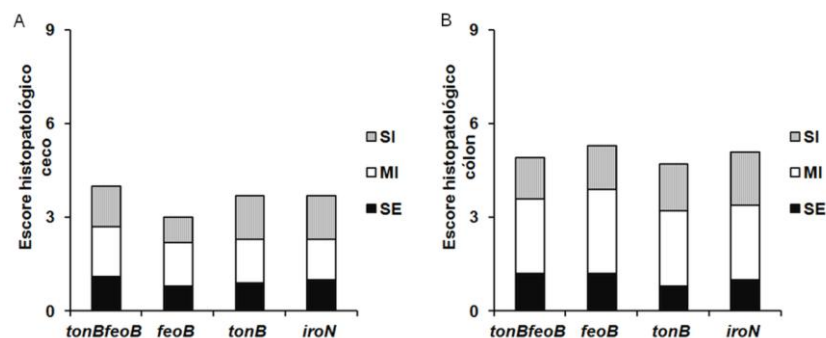


Figura 7. Inflamação intestinal em camundongos tratados com DSS e coinfectados com cepa referência e mutante de *Salmonella* Typhimurium. Camundongos C57Bl/6 foram coinfectados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*. (A-B) Escore histopatológico do ceco (A) e cólon (B) 48 hpi. As barras representam a média do escore histopatológico para inflamação de submucosa (IS), inflamação de mucosa (IM) e edema de submucosa (ES) de cinco animais por grupo coinfectado.

No modelo murino tratado com DSS, o índice de competitividade da cepa de referência sobre a mutante *tonB* indicou que a cepa de referência cresceu 15 e 13 vezes mais que a mutante em amostras de ceco e cólon, respectivamente, coletadas às 48 hpi (Figura 8A e 8B). Os resultados foram similares na coinfeção com o mutante *tonB feoB* e com a mutante *iroN*. O índice de competitividade da cepa de referência sobre a *tonB feoB* foi seis e 14 em amostras de ceco e cólon, respectivamente, e o da cepa de referência sobre a *iroN* foi cinco nas amostras de ceco e seis nas amostras de cólon (Figura 8A e 8B). A mutante *feoB*, no entanto, foi recuperada em quantidade igual à cepa de referência no ceco dos animais tratados com DSS e infectados (Figura 8A), e três vezes menos em amostras de cólon neste modelo animal (Figura 8B). Estes resultados em conjunto indicam que em meio cuja inflamação é induzida quimicamente pelo tratamento com DSS, os mecanismos de obtenção de ferro em mutantes *tonB feoB*, *tonB* e *iroN* induzem diminuição da vantagem de multiplicação a *S. Typhimurium*.

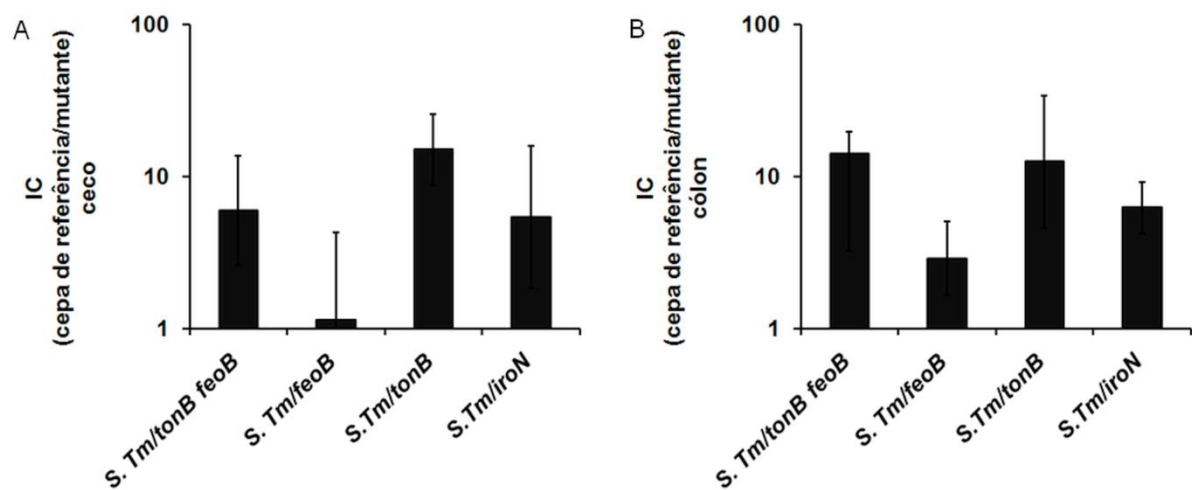


Figura 8. Colonização intestinal de camundongos tratados com DSS e coinfectados com cepa referência e mutante de *Salmonella Typhimurium*. Camundongos C57Bl/6 foram coinfectados intragastricamente na proporção 1:1 com mistura de 1×10^7 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN*. Amostras de ceco (A) e cólon (B) coletadas após 48 horas de infecção para contagem bacteriana. Os dados estão expressos em média e erro padrão do índice de competitividade das cepas de referência de *S. Typhimurium* sobre mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iroN* (*S. Tm*/mutante) normalizados pela razão dos respectivos inóculos em cinco animais por grupo coinfectado.

4.5 COLONIZAÇÃO INTESTINAL DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM E MUTANTES *TONB* *FEOB*, *FEOB*, *TONB*, *IRON*, OU CEPA MUTANTE DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM *INVA* E MUTANTES *INVA* *TONB* *FEOB*, *INVA* *FEOB*, *INVA* *TONB* OU *INVA* *IRON* EM BEZERROS COM ALÇAS ILÍACAS CIRURGICAMENTE LIGADAS

A vantagem competitiva da *Salmonella* mediada pelas diferentes vias de absorção de ferro, observada no modelo murino, foi avaliada em bovinos, espécie hospedeira natural da infecção por *S. Typhimurium* que desenvolve inflamação intestinal aguda semelhante à manifestação clínica e patológica de infecção por *S. Typhimurium* em seres humanos (COSTA *et al.*, 2012). As proteínas efetoras do T3SS-1 codificados pelo SPI-1 mediam o influxo de neutrófilos e o acúmulo de fluido no lúmen intestinal no modelo de ligadura ileal de bezerros (SANTOS *et al.*, 2002b; ZHANG *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2012). A razão para o uso no presente trabalho da alça ileal de bezerro cirurgicamente ligada foi baseada em estudos anteriores que demonstraram que 5 hpi por *S. Typhimurium* em macacos Rhesus submetidos à ligadura de alça ilíaca há aumento da secreção de IL-17 (Raffatellu *et al.*, 2008) e lipocalina-2 (Raffatellu *et al.*, 2009). Assim como os bovinos, os primatas são hospedeiros naturais de *S. Typhimurium* e apresentam sinais clínicos que se assemelham aos observados em pacientes humanos (KENT *et al.*, 1966; SANTOS *et al.*, 2011).

No presente estudo, o fluido ileal e tecido ileal de alças cirurgicamente ligadas foram coletados 8 hpi de alças inoculadas com uma mistura 1:1 da cepa de referência e uma das mutantes, de modo semelhante ao que foi realizado em camundongos pré-tratados com estreptomicina. Embora a coinfeção da cepa de referência e *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* ou *iroN* tenha induzido alteração inflamatória proeminente às 8 hpi na mucosa ileal bovina, no modelo de ligadura de alças ilíacas, a cepa de referência apresentou multiplicação em fluido intestinal e no íleo em números semelhante a das mutantes com deleção dos mecanismos de absorção de Fe^{2+} e Fe^{3+} e o mesmo ocorreu durante coinfeção com a mutante *invA* e *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iroN* nas amostras de fluido e íleo (Figura 9). Esta foi a primeira tentativa de usar modelo de ligadura ileal de bezerro para elucidar os mecanismos de absorção de ferro por *S. Typhimurium*. O modelo de alças ilíacas cirurgicamente ligadas tem uma limitação intrínseca, que é poder ser realizado apenas por algumas horas uma vez que o bezerro permanece sob anestesia durante todo o experimento (ALVES *et al.*, 2003). O período

de multiplicação de *S. Typhimurium* neste modelo é limitado à 8 hpi, o que pode explicar o porquê deste ensaio não ter demonstrado nenhuma vantagem competitiva das cepas que possuem as vias de captação de ferro em comparação com as cepas mutantes.

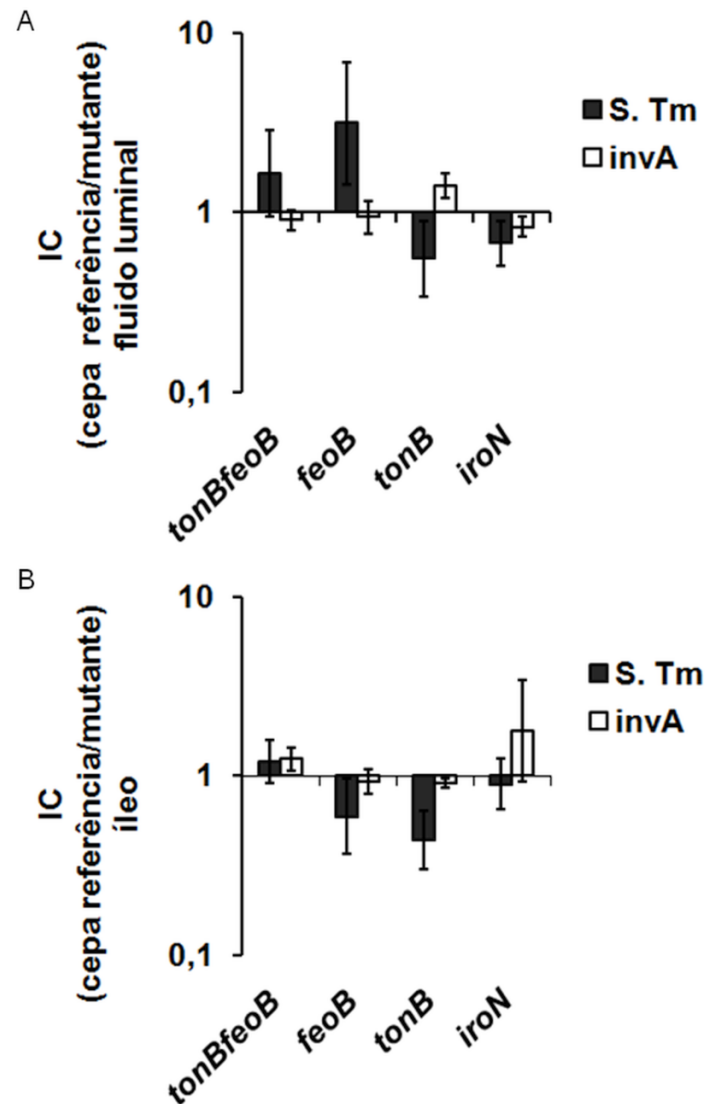


Figura 9. Colonização intestinal em modelo de ligadura de alça ilíaca de bezerros e coinfestado com cepa referência e mutante de *Salmonella Typhimurium*. As alças ilíacas de bezerros foram ligadas cirurgicamente e coinfetadas na proporção 1:1 com mistura de 1×10^9 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* e uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iron*, ou foram coinfetadas com a cepa mutante de *S. Typhimurium* *invA* e uma das mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iron*. Amostras de fluido intraluminal (A) e de biópsia de íleo (B) foram coletadas 8 horas após infecção para contagem bacteriana. Os dados estão expressos em média e erro padrão do índice de competitividade das cepas de referência de *S. Typhimurium* sobre mutantes *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, ou *iron* (*S. Tm*) e do índice de competitividade das cepas mutante *invA* de *S. Typhimurium* sobre mutantes *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* ou *invA iron* (*invA*) normalizados pela razão dos respectivos inóculos de 4 animais coinfetados.

5. CONCLUSÕES

Os modelos murinos pré-tratado com estreptomicina e o tratado com DSS possibilitaram avaliar os genes de *S. Typhimurium* responsáveis pela absorção de ferro férrico e ferroso que são importantes para multiplicação bacteriana no intestino inflamado. Nestes modelos murinos, a absorção de ferro férrico mediada pela salmoquelina e pela proteína de membrana TonB de *S. Typhimurium* proporcionaram uma vantagem competitiva a *S. Typhimurium* no ambiente intestinal inflamado, seja pela ação do T3SS-1 de *S. Typhimurium* ou por inflamação induzida quimicamente, pela administração de DSS. A captação de ferro Fe²⁺ mediada pelo FeoB também favorece a colonização intestinal por *S. Typhimurium* em camundongos pré-tratados com estreptomicina, mas ocorre independente da inflamação induzida pelo T3SS-1 de *S. Typhimurium* e não é observada no intestino de camundongos com inflamação induzida pelo DSS.

CAPÍTULO III

PAPEL DOS GENES *VIAB* E *TVIA* DE *SALMONELLA ENTERICA* SOROTIPO TYPHI NA EVASÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NO INTESTINO DE BEZERROS COM ALÇAS ILÍACAS CIRURGICAMENTE LIGADAS

1. INTRODUÇÃO

A febre tifoide acomete anualmente 20 milhões de indivíduos e causa 200 mil mortes em todo o mundo (CRUMP *et al.*, 2004). A doença é causada por *Salmonella enterica* sorotipos Typhi (*S. Typhi*) ou Paratyphi A, B ou C (*S. Paratyphi*). Ao contrário da enterite neutrofílica aguda induzida por *S. Typhimurium*, a infecção por *S. Typhi* ou Paratyphi causa uma enfermidade sistêmica caracterizada por febre persistente, dores abdominais, hepatomegalia e esplenomegalia (DAS *et al.*, 2014) restrita à espécie humana. Apesar da caracterização clínica e da restrição de infecção por *S. Typhi* apenas aos seres humanos serem aspectos que evidenciam a distinção existente entre a enterite não-tifoide e a febre tifoide, *S. Typhi* possui fatores de virulência comuns a *S. Typhimurium*, como as SPI-1 e SPI-2, e a expressão de padrões moleculares associados à patógenos (MAMPs) como flagelina e LPS (RAFFATELLU *et al.*, 2006)

S. Typhi adquiriu possivelmente por transferência genética horizontal a SPI-7, ilha de patogenicidade ausente no genoma de *S. Typhimurium* e de *S. Paratyphi* (MCCLELLAND *et al.*, 2004). A SPI-7 contém os genes do operon *viaB*, responsáveis pela síntese da proteína capsular de *S. Typhi* denominada Vi (HASHIMOTO *et al.*, 1991). Estudos recentes têm relacionado a produção de capsula Vi à menor resposta inflamatória induzida durante fase inicial de infecção por *S. Typhi*. HIROSE *et al.* (1997) demonstraram que em cultivo *in vitro* de macrófagos humanos, a deleção da capsula Vi em *S. Typhi* resulta em diminuição na multiplicação intramacrofágica da mutante, associada a maior secreção de TNF- α pelas células infectadas. Em cultivo *in vitro* em células intestinais da linhagem Caco-2, a interação entre dois domínios da membrana da célula eucariota com a proteína Vi capsular solúvel de *S. Typhi* ou com *S. Typhi* que apresenta a proteína Vi em sua superfície induzem menor secreção de CXCL-8 quando comparada a *S. Typhi* mutante que não expressa a proteína capsular (SHARMA e QADRI, 2004). RAFFATELLU *et al.* (2005b) demonstraram que a proteína Vi de *S. Typhi* induz menor expressão de CXCL-8 via TLR5 ou TLR4/MD2/CD14 dependente. WILSON *et al.* (2008) observaram que a infecção por *S. Typhimurium* mutante que expressa a proteína capsular Vi induz menor expressão de TNF- α e óxido nítrico sintetase (iNOS) no fígado de camundongos infectados, de forma dependente de TLR4.

Portanto, a proteína capsular Vi é um fator de virulência utilizado por *S. Typhi* para bloquear a quimiotaxia de neutrófilos na fase inicial de infecção (WANGDI *et al.*, 2014). Os genes relacionados à regulação (*tviA*), biossíntese (*tviBCDE*) e exportação (*vexABCDE*) da proteína Vi estão localizados no locus *viaB*, no operon *tviABCDEvexABCDE* da SPI-7 de *S. Typhi*. WINTER *et al.*, (2008) demonstraram que a função moduladora da secreção de CXCL-8 desempenhada pela proteína Vi é atribuída à expressão da sua proteína regulatória TviA em estudos de infecção por *S. Typhi* na linhagem celular T84 (derivada de adenocarcinoma de cólon). Ainda em células T84 infectadas, a introdução do gene *tviA* em *S. Typhimurium* reduz a secreção de CXCL-8 e de flagelina (WINTER *et al.*, 2008).

Os estudos que destacam os mecanismos de virulência de *S. Typhi* relacionados à modulação e bloqueio da inflamação neutrofílica no início da infecção intestinal no hospedeiro são de extrema importância para entendimento da patogenia de *S. Typhi*. Entretanto, a limitação da ocorrência de febre tifoide oriunda da infecção por *S. Typhi* restrita ao ser humano, tendo como único modelo experimental o chimpanzé (EDSALL *et al.*, 1960), restringe os estudos

experimentais. O modelo de infecção experimental por *S. Typhimurium* em alça ilíaca cirurgicamente ligada é fortemente pertinente para estudos sobre a patogenia de *S. Typhimurium* no ambiente intestinal inflamado (COSTA *et al.*, 2012). RAFFATELLU *et al.* (2007) observaram que a infecção por mutante *S. Typhi* com deleção do gene *viaB* induz maior acúmulo de fluido intraluminal e maior transcrição de *cxcl-1* e *Il-17* que a infecção pela cepa selvagem de *S. Typhi* no modelo de alças ilíacas cirurgicamente ligadas de bezerros. A infecção no mesmo modelo animal com a cepa de *S. Typhimurium* que expressa o gene *viaB* de *S. Typhi* induz resultado inverso, de diminuição da expressão de *cxcl-1* e *Il-17*. Com isto, o modelo de ligadura de alça ilíaca demonstrou ser ferramenta alternativa para estudo dos mecanismos de patogenicidade presentes em *S. Typhi* e ausentes em *S. Typhimurium*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho avaliou o papel dos genes *viaB* e *tviA* de *S. Typhi* na supressão de inflamação *in vivo*, através da utilização do modelo de alças ilíacas de bezerros cirurgicamente ligadas. Assim, o presente estudo visou avaliar a capacidade de invasão e indução de inflamação da amostra virulenta de *S. Typhimurium* e seus mutantes que expressam o gene *viaB* e o *tviA*, através da mensuração do volume de fluido intraluminal, cultura bacteriana do intestino, e histopatologia do íleo de bezerros. Os objetivos específicos foram:

- I. Determinar a capacidade de indução de inflamação da amostra virulenta de *S. Typhimurium* e as respectivas mutantes em alças ilíacas de bezerros cirurgicamente ligadas, pela mensuração de fluido luminal produzido e análise histopatológica de fragmentos de íleo infectados.
- II. Determinar a capacidade de invasão da amostra virulenta de *S. Typhimurium* e das respectivas mutantes em alças ilíacas de bezerros cirurgicamente ligadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob os números de protocolos 197/2008.

3.2 CEPAS DE BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

As cepas de *S. Typhimurium* utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 5. A cepa IR715 é *S. Typhimurium* naturalmente resistente ácido nalidíxico derivada da cepa selvagem ATCC 14028. As cepas foram cedidas pelo *Department Medical Microbiology and Immunology da University of California at Davis*. Todas as bactérias foram cultivadas em ambiente aeróbico a 37°C. Os meios de cultivo microbiológico utilizados foram o meio LB (10g triptona, 5g extrato de levedura, 5g NaCl por litro) e LB ágar (10g triptona, 5g extrato de levedura, 5g NaCl, 13g ágar bacteriológico por litro). Quando apropriado, foram adicionados os antibióticos nos meio de cultivo microbiológico nas seguintes concentrações: gentamicina a 50 mg/L (Sigma Aldrich, EUA); ácido nalidíxico a 50 mg/L (Sigma Aldrich, EUA).

Tabela 5. Cepas de *Salmonella Typhimurium* utilizadas

Cepa	Genótipo	Referência
AJB715	IR715 <i>phoN::Kan^R</i> ^a	KINGSLEY <i>et al.</i> , 2003
SW474	IR715 <i>phoN::tviA-Cm^R</i>	WINTER <i>et al.</i> , 2009b
SW737	IR715 <i>phoN::Kan^R ΔinvA::Tet^R</i>	WINTER <i>et al.</i> , 2014 ³
TH170	IR715 <i>phoN::viaB</i>	HANEDA <i>et al.</i> , 2009

^aKan^R: resistente à canamicina; Tet^R: resistente à tetraciclina (*tetRA*); Cm^R: resistente à cloranfenicol.

3.3 MODELO DE ALÇAS ILÍACAS DE BEZERROS CIRURGICAMENTE LIGADAS

Quatro bezerros machos de 4 semanas de idade foram submetidos à cirurgia conforme descrito por SANTOS *et al.* (2002a) e na seção de material e métodos do Capítulo II. As alças ilíacas ligadas foram inoculadas com injeção intraluminal de 3 mL de meio LB contendo 1 x 10⁸ UFC da cepa de referência *phoN* (AJB715), *viaB* (TH170), *tviA* (SW474), ou de *invA* (SW737). As alças intestinais foram recolocadas no interior da cavidade abdominal dos

³ O CAPÍTULO III listado proveio de estudo de colaboração que possibilitou a geração do artigo científico escrito por Winter *et al.* (2014) gerado durante o doutorado da aluna Luciana Fachini da Costa (Anexo C).

animais até eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia 5 hpi com sobredose de anestésico inalatório. As amostras de tecido e fluido intraluminal foram coletadas para pesagem de fluido luminal, cultivo bacteriano e histopatologia. Um fragmento de íleo por porção de alça inoculada foi removido por *punch* de biópsia de 6 mm. As biópsias retiradas foram mantidas em PBS com gentamicina durante uma hora (50 µg/mL), após o qual foram homogeneizadas em 2 mL de PBS estéril e macerados. A solução obtida foi semeada em ágar LB contendo ácido nalidíxico.

3.4 HISTOPATOLOGIA

Fragmentos de íleo foram fixados em formalina 10%, incluídos em parafina, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e embebidos pela parafina. Os blocos de parafina contendo o tecido fixado foram cortados em micrótomo e geraram lâminas histológicas com a espessura de 5 µm que foram destinadas à coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Os cortes histológicos foram analisados quanto às alterações inflamatórias nos seguintes escores: 0 – ausência de lesão; 1 – lesão discreta; 2 – lesão moderada e 3- lesão intensa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar se a inserção dos genes *viaB* e *tviA* em *S. Typhimurium* induz menor inflamação intestinal, a infecção experimental foi induzida no modelo de ligadura de alças ilíacas de bezerros. Após inativação das bactérias extracelulares com o tratamento com gentamicina, os fragmentos de íleo foram macerados e plaqueados em diluição seriada. As mutantes de *S. Typhimurium* *viaB* e *tviA* foram recuperadas em mesmo número de UFC/mL que a cepa de referência de *S. Typhimurium* nas amostras de íleo de bezerros obtidas 5 hpi (Figura 10), o que indica que o *locus viaB* e o gene regulador da proteína Vi capsular, o gene *tviA*, não alteram a capacidade de invasão de *S. Typhimurium*. A deleção do gene *invA* do T3SS-1 de invasão de *S. Typhimurium* induz menor recuperação bacteriana após tratamento com gentamicina, como esperado (Figura 10).

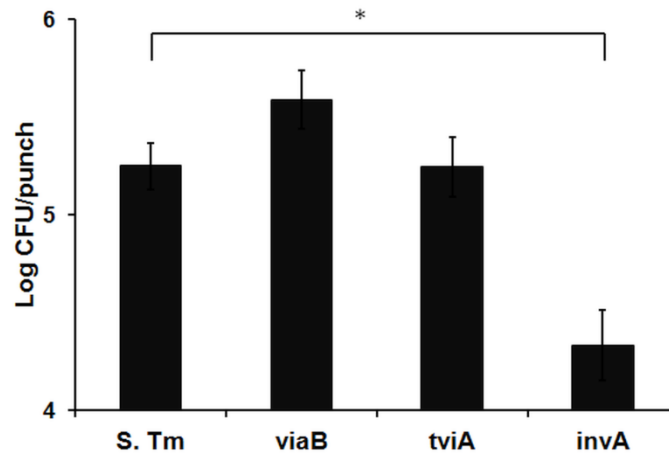


Figura 10. Colonização intestinal do modelo de ligadura de alça ílica de bezerros infectados com cepa de referência ou mutante *viaB*, *tvIA* ou *invA* de *Salmonella* Typhimurium. As alças ílicas de bezerros foram ligadas cirurgicamente e infectadas com 1×10^8 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* (*S. Tm*) ou uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *viaB*, *tvIA*, *invA*. Amostras teciduais foram coletadas por biópsia após 5 horas de infecção para contagem bacteriana. Os dados estão expressos em média e erro padrão do Log de UFC/punch de quatro animais coinfectados. * $P < 0,05$.

As alças intestinais inoculadas com a cepa de referência AJB715 de *S. Typhimurium* apresentaram maior acúmulo de fluido luminal quando comparadas às porções ílicas infectadas com as mutantes *tvIA* e *viaB* e *invA*, e as mutantes *viaB* e *tvIA* não apresentaram diferença em relação ao acúmulo de fluido luminal (Figura 11). O acúmulo de fluido luminal no modelo de infecção por *S. Typhimurium* de alças ílicas de bezerros ligadas é uma medida indireta da indução de diarreia. A infiltração de neutrófilos no intestino de bezerros infectados por *S. Typhimurium* induz perda de integridade epitelial e efusão de exsudato rico em proteínas para o lúmen intestinal (SANTOS *et al.*, 2001a). A redução da inflamação intestinal foi confirmado pela histopatologia (Figura 12A), evidenciado pelo intenso infiltrado neutrófilo na mucosa e submucosa do íleo infectado pela cepa de referência de *S. Typhimurium* (Figura 12C), com menor intensidade de inflamação nas alças infectadas com as cepas contendo *viaB* (Figura 12D) e *tvIA* (Figura 12E).

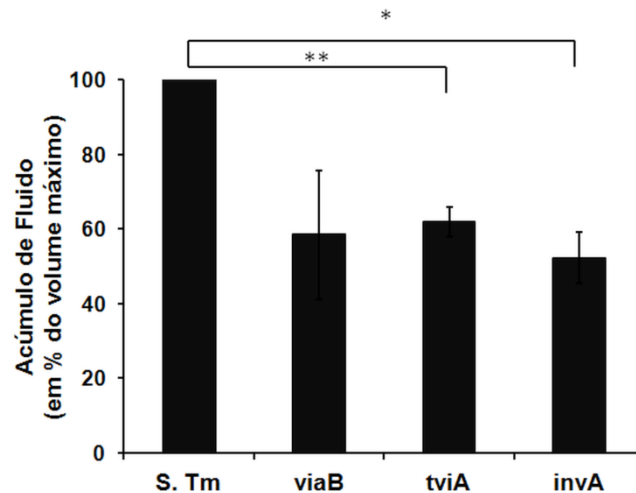


Figura 11. Acúmulo de fluido luminal em modelo de ligadura de alça ílica de bezerros infectados com cepa de referência ou mutante *viaB*, *tviA* ou *invA* de *Salmonella Typhimurium*. As alças ílicas de bezerros foram ligadas cirurgicamente e infectadas com 1×10^8 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* (*S. Tm*) ou uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *viaB*, *tviA*, *invA*. A quantidade de fluido acumulado por alça ligada foi coletado 5 horas após infecção. Os dados estão expressos como percentual de resposta observado em relação à alça infectada com a cepa de referência (AJB715) de *S. Typhimurium*. As barras representam as média e erro padrão do Log de UFC/punch de quatro animais coinfectados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

A introdução do locus *viaB* altera a resposta inflamatória *in vivo*, por reduzir a expressão de citocinas, o recrutamento de neutrófilos e o acúmulo de fluido em bezerros infectados com a *S. Typhimurium viaB* mutante (RAFFATELLU *et al.*, 2007). Nossos resultados indicaram que a atividade anti-inflamatória do *viaB* é atribuída ao gene regulatório *tviA*.

WINTER *et al.* (2014) realizaram experimentos adicionais e observaram que o mecanismo pelo qual a TviA da *S. Typhi* age pela supressão do T3SS-1 e desta forma previne a inflamação neutrofílica no processo inicial de infecção por *S. Typhi*.

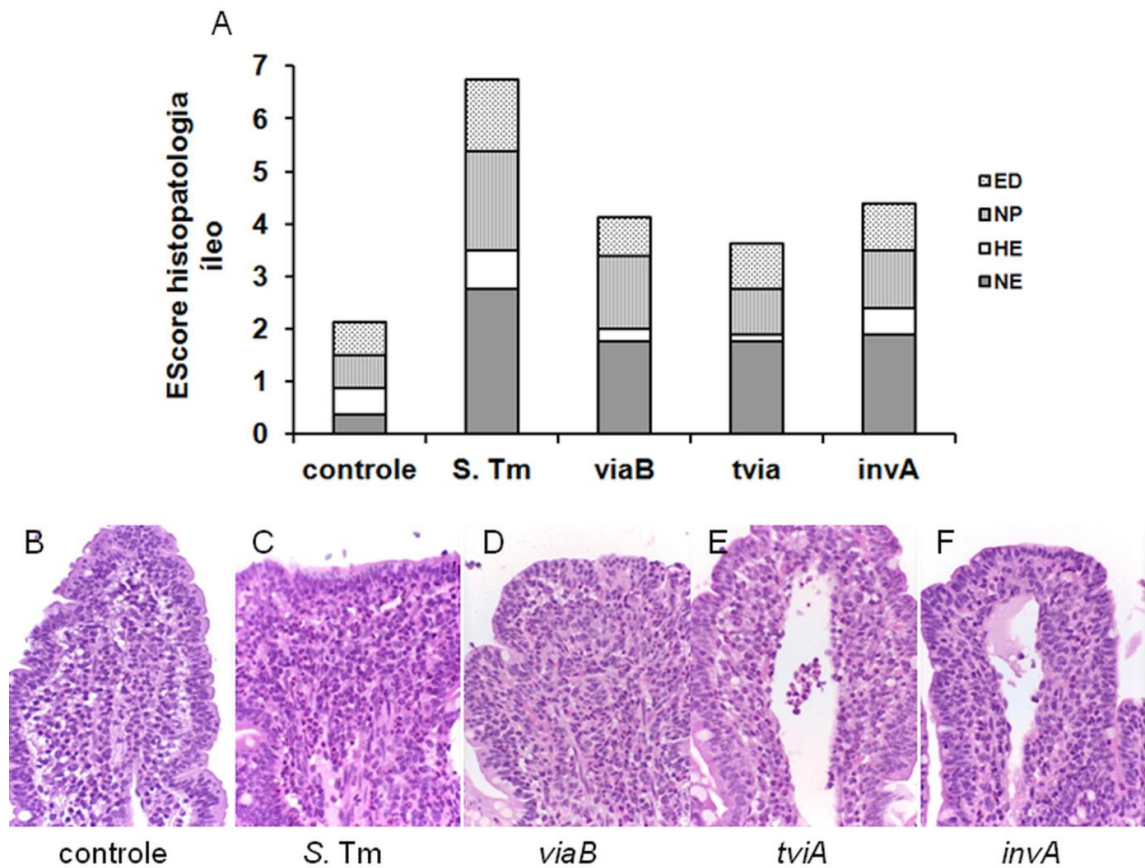


Figura 12. Inflamação no modelo de ligadura de alça ílica de bezerros e infectados com cepa de referência ou mutante *viaB*, *tvia* ou *invA* de *Salmonella Typhimurium*. As alças ílicas de bezerros ligadas cirurgicamente foram infectadas com 1×10^8 UFC com a cepa de referência de *S. Typhimurium* (*S. Tm*) ou uma das mutantes de *S. Typhimurium*: *viaB*, *tvia*, *invA*. (A) Fragmentos de íleo das alças ligadas foi coletado após 5 horas de infecção para avaliação do escore histopatológico. Barras representam a média do escore histopatológico para infiltrado neutrofílico (NE), hemorragia (HE), necrose/apoptose (NP) e edema (ED) de fragmentos obtidos de quatro animais infectados. (B-C) Histopatologia de fragmentos de íleo coletados 5 hpi inoculado com LB (B) ou infectados com a cepa de referência de *S. Typhimurium* (C), com a cepa mutante *viaB* (D), *tvia* (E) ou *invA* de *S. Typhimurium* (F) corados por hematoxilina-eosina, 600x.

5. CONCLUSÃO

A inserção e expressão do gene regulatório *tvia* e do locus *viaB* diminuem a indução de resposta inflamatória produzida pela *S. Typhimurium* no íleo de alças de bezerros cirurgicamente ligadas e infectadas.

REFERÊNCIAS

- AILES, E.; BUDGE, P.; SHANKAR, M.; COLLIER, S.; BRINTON, W.; CRONQUIST, A.; CHEN, M.; THORNTON, A.; BEACH, M.J. e BRUNKARD, J.M. Economic and Health Impacts Associated with a *Salmonella* Typhimurium Drinking Water Outbreak– Alamosa, CO. **PLoS One**. v.8, p.e57439, 2013.
- ALVES, G.E.S.; HARTSFIELD, S.M.; CARROLL, G.L.; SANTOS, D.A.M.L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J.; ADAMS, L.G. e SANTOS, R.L. Emprego do propofol, isoflurano e morfina para a anestesia geral de longa duração em bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, p.411–420, 2003.
- AUJLA, S.J.; CHAN, Y.R.; ZHENG, M.; FEI, M.; ASKEW, D.J.; POCIASK, D.A.; REINHART, T.A.; MCALLISTER, F.; EDEAL, J. e GAUS, K. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. **Nature Medicine**. v.14, p.275-281, 2008.
- BAJAJ, V.; LUCAS, R.L.; HWANG, C. e LEE, C.A. Co-ordinate regulation of *Salmonella* typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. **Molecular Microbiology**. v.22, p.703-714, 1996.
- BAKOWSKI, M.A.; BRAUN, V.; LAM, G.Y.; YEUNG, T.; DO HEO, W.; MEYER, T.; FINLAY, B.B.; GRINSTEIN, S. e BRUMELL, J.H. The phosphoinositide phosphatase SopB manipulates membrane surface charge and trafficking of the *Salmonella*-containing vacuole. **Cell Host & Microbe**. v.7, p.453-462, 2010.
- BARTHEL, M.; HAPFELMEIER, S.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; KREMER, M.; ROHDE, M.; HOGARDT, M.; PFEFFER, K.; RUSSMANN, H. e HARDT, W.D. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. **Infection and Immunity**. v.71, p.2839-2858, 2003.
- BÄUMLER, A.J. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. **Trends in Microbiology**. v.5, p.318-322, 1997.
- BÄUMLER, A.J.; NORRIS, T.L.; LASCO, T.; VOIGHT, W.; REISSBRODT, R.; RABSCH, W. e HEFFRON, F. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**. v.180, p.1446–1453, 1998b.
- BÄUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; FICHT, T.A. e ADAMS, L.G. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. **Infection and Immunity**. v.66, p.4579-4587, 1998a.
- BEHNSEN, J.; JELLBAUER, S.; WONG, C.P.; EDWARDS, R.A.; GEORGE, M.D.; OUYANG, W. e RAFFATELLU, M. The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. **Immunity**. v.40, p.262-273, 2014.
- BENJAMIN, W.H.; JR, TURNBOUGH, C.L.; JR, POSEY, B.S. e BRILES, D.E. The ability of *Salmonella* Typhimurium to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. **Infection and Immunity**. v.50, p.392-397, 1985.

- BENNETT, S.; LITTRELL, K.W.; HILL, T.A.; MAHOVIC, M. e BEHRAVESH, C.B. Multistate foodborne disease outbreaks associated with raw tomatoes, United States, 1990–2010: a recurring public health problem. **Epidemiology and Infection**. v.143, p.1352-1359, 2014.
- BJARNASON, J.; SOUTHWARD, C.M. e SURETTE, M.G. Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. **Journal of Bacteriology**. v.185, p.4973-4982, 2003.
- BOYD, J.F. Pathology of the alimentary tract in *Salmonella typhimurium* food poisoning. **Gut**. v.26, p.935-944, 1985.
- BRUNO, V.M.; HANNEMANN, S.; LARA-TEJERO, M.; FLAVELL, R.A.; KLEINSTEIN, S.H. e GALÁN, J.E. *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. **PLoS Pathogens**. v.5, p.e1000538, 2009.
- BUCKLE, G.C.; WALKER, C.L.F. e BLACK, R.E. Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. **Journal of Global Health**. v.2, p.010401, 2012.
- CARPENTER, C. e PAYNE, S.M. Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in response to oxygen and iron availability. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.133, p.110-117, 2014.
- CARTER, P.B. e COLLINS, F.M. Growth of typhoid and paratyphoid bacilli in intravenously infected mice. **Infection and Immunity**. v.10, p.816-822, 1974.
- CAVALLARO, E.; DATE, K.; MEDUS, C.; MEYER, S.; MILLER, B.; KIM, C.; NOWICKI, S.; COSGROVE, S.; SWEAT, D.; PHAN, Q.; FLINT, J.; DALY, E.R.; ADAMS, J.; HYYTIA-TREES, E.; GERNER-SMIDT, P.; HOEKSTRA, R.M.; SCHWENSOHN, C.; LANGER, A.; SODHA, S.V.; ROGERS, M.C.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WILLIAMS, I.T.; BEHRAVESH, C.B. e SALMONELLA TYPHIMURIUM OUTBREAK INVESTIGATION TEAM. *Salmonella* Typhimurium infections associated with peanut products. **New England Journal of Medicine**. v.365, p.601-610, 2011.
- CAVALLO, S.J.; DALY, E.R.; SEIFERTH, J.; NADEAU, A.M.; MAHONEY, J.; FINNIGAN, J.; WIKOFF, P.; KIEBLER, C.A. e SIMMONS, L. Human Outbreak of *Salmonella* Typhimurium Associated with Exposure to Locally Made Chicken Jerky Pet Treats, New Hampshire, 2013. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.12, p.441-446, 2015.
- CHIU, C.H.; SU, L.H. e CHU, C. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**. v.17, p.311-322, 2004.
- CONNOR, B.A. e SCHWARTZ, E. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. **The Lancet Infectious Diseases**. v.5, p.623-628, 2005.
- COOMBES, B.K.; BROWN, N.F.; VALDEZ, Y.; BRUMELL, J.H. e FINLAY, B.B. Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to

acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. **The Journal of Biological Chemistry**. v.279, p.49804-49815, 2004.

COSTA, L.F.; PAIXÃO, T.A.; TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J. e SANTOS, R.L. Salmonellosis in cattle: advantages of being an experimental model. **Research in Veterinary Science**. v.93, p.1-6, 2012.

CRUMP, J.A.; LUBY, S.P. e MINTZ, E.D. The global burden of typhoid fever. **Bulletin of the World Health Organization**. v.82, p.346-353, 2004.

DAS, S.K.; CHISTI, M.J.; AFRAD, M.H.; MALEK, M.A.; AHMED, S.; FERDOUS, F.; FARZANA, F.D.; DAS, J.; SHAHUNJA, K.; AFROZE, F.; SALAM, M.A.; AHMED, T.; FARUQUE, A.S.; BAKER, P.J. e AL MAMUN, A. Gastroenteritis due to typhoidal *Salmonella*: a decade of observation at an urban and a rural diarrheal disease hospital in Bangladesh. **BMC Infectious Diseases**. v.14, p.1-8, 2014.

DAY, D.W.; MANDAL, B.K. e MORSON, B.C. The rectal biopsy appearances in *Salmonella* colitis. **Histopathology**. v.2, p.117-131, 1978.

DE JONG, H.K.; PARRY, C.M.; VAN DER POLL, T. e WIERSINGA, W.J. Host–pathogen interaction in invasive salmonellosis. **PLoS Pathogens**. v.8, p.e1002933, 2012.

DERIU, E.; LIU, J.Z.; PEZESHKI, M.; EDWARDS, R.A.; OCHOA, R.J.; CONTRERAS, H.; LIBBY, S.J.; FANG, F.C. e RAFFATELLU, M. Probiotic bacteria reduce *Salmonella* Typhimurium intestinal colonization by competing for iron. **Cell Host & Microbe**. v.14, p.26-37, 2013.

EDSALL, G.; GAINES, S.; LANDY, M.; TIGERTT, W.D.; SPRINZ, H.; TRAPANI, R.J.; MANDEL, A.D. e BENENSON, A.S. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. I. Typhoid fever in chimpanzees orally infected with *Salmonella typhosa*. **Journal of Experimental Medicine**. v.112, p.143-166, 1960.

FANG, F.C. e FIERER, J. Human infection with *Salmonella* dublin. **Medicine**, v.70, p.198-207, 1991.

FEARNLEY, E.; RAUPACH, J.; LAGALA, F. e CAMERON, S. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008. **International Journal of Food Microbiology**. v.146, p.219-227, 2011.

FEASEY, N.A.; DOUGAN, G.; KINGSLEY, R.A.; HEYDERMAN, R.S. e GORDON, M.A. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. **Lancet**. v.379, p.2489-2499, 2012.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; DIAS, A.M.; DE ALMEIDA, I.A.Z.C. e DE MELO, L.C.V. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.48, p.179-184, 2006.

FIGUEIRA, R. e HOLDEN, D.W. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. **Microbiology**. v.158, p.1147-1161, 2012.

- FINLEY, R.; REID-SMITH, R. e WEESE, J.S. Human health implications of *Salmonella*-contaminated natural pet treats and raw pet food. **Clinical Infectious Diseases**. v.42, p.686-691, 2006.
- FLO, T.H.; SMITH, K.D.; SATO, S.; RODRIGUEZ, D.J.; HOLMES, M.A.; STRONG, R.K.; AKIRA, S. e ADEREM, A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. **Nature**. v.432, p.917-921, 2004.
- GÁLAN, J.E. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v.17, p.53-86, 2001.
- GARNER, C.D.; ANTONOPOULOS, D.A.; WAGNER, B.; DUHAMEL, G.E.; KERESZTES, I.; ROSS, D.A.; YOUNG, V.B. e ALTIER, C. Perturbation of the small intestine microbial ecology by streptomycin alters pathology in a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium murine model of infection. **Infection and Immunity**. v.77, p.2691–2702, 2009.
- GENDREL, D.; KOMBILA, M.; BEAUDOIN-LEBLEVEC, G. e RICHARD-LENOBLE, D. Nontyphoidal Salmonellal septicemia in Gabonese children infected with *Schistosoma intercalatum*. **Clinical Infectious Diseases**. v.18, p.103-105, 1994.
- GODINEZ, I.; HANEDA, T.; RAFFATELLU, M.; GEORGE, M.D.; PAIXAO, T.A.; ROLAN, H.G.; SANTOS, R.L.; DANDEKAR, S.; TSOLIS, R.M. e BÄUMLER, A.J. T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. **Infection and Immunity**. v.76, p.2008-2017, 2008.
- GODINEZ, I.; RAFFATELLU, M.; CHU, H.; PAIXAO, T.A.; HANEDA, T.; SANTOS, R.L.; BEVINS, C.L.; TSOLIS, R.M. e BÄUMLER, A.J. Interleukin-23 orchestrates mucosal responses to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestine. **Infection and Immunity**. v.77, p.387-398, 2009.
- GONZALEZ-ESCOBEDO, G. e GUNN, J.S. Gallbladder epithelium as a niche for chronic *Salmonella* carriage. **Infection and Immunity**. v.81, p.2920-2930, 2103.
- GORDON, M.A. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. **Journal of Infection**. v.56, p.413-422, 2008
- GRIMONT, P.A.D. e WEILL, F.. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9 th ed. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France**, 2007. Disponível em:
http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrechr/salmoms/WKLM_En.pdf.
- GUNN, J.S.; MARSHALL, J.M.; BAKER, S.; DONGOL, S.; CHARLES, R.C. e RYAN, E.T. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. **Trends in Microbiology**. v.22, p.648-655, 2014.
- HANEDA, T.; WINTER, S.E.; BUTLER, B.P.; WILSON, R.P.; TUKEL, C.; WINTER, M.G.; GODINEZ, I.; TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J. The capsule-encoding *viaB* locus reduces intestinal inflammation by a *Salmonella* pathogenicity island 1-independent mechanism. **Infection and Immunity**. v.77, p.2932–2942, 2009.

- HAPFELMEIER, S.; STECHER, B.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; MULLER, A.J.; HEIKENWALDER, M.; STALLMACH, T.; HENSEL, M.; PFEFFER, K.; AKIRA, S. e HARDT, W.D. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. **Journal of Immunology**. v.174, p.1675-1685, 2005.
- HARRIS, J.C.; DUPONT, H.L. e HORNICK, R.B. Fecal leukocytes in diarrheal illness. **Annals of Internal Medicine**. v.76, p.697-703, 1972.
- HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; LI, N. e YAMAMOTO, H.. Molecular cloning of the ViaB region of *Salmonella* typhi. **FEMS Microbiology Letters**.v.90, p.53-56, 1991.
- HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**. v.294, p.95-102, 2004.
- HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U. e ANDREWS, N.C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**. v.117, p.285-297, 2004.
- HERNANDEZ, L.D.; HUEFFER, K.; WENK, M.R. e GALAN, J.E. *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. **Science**. v.304, p.1805-1807, 2004.
- HIROSE, K.; EZAKI, T.; MIYAKE, M.; LI, T.; KHAN, A.Q.; KAWAMURA, Y.; YOKOYAMA, H. e TAKAMI, T. Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted *Salmonella* typhi strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen. **FEMS Microbiology Letters**. v.147, p.259-265, 1997.
- HOELZER, K.; MORENO SWITT, A.I. e WIEDMANN, M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. **Veterinary Research**. v.42, p.1-27, 2011.
- HOFFMANN, S.; BATZ, M.B. e MORRIS JR, J.G. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**. v. 75, p.1292-1302, 2012.
- HUGHES, L.E.; GIBSON, E.A.; ROBERTS, H.E.; DAVIES, E.T.; DAVIES, G. e SOJKA, W.J. Bovine salmonellosis in England e Wales. **The British Veterinary Journal**. v.127, p.225-238, 1971.
- IMANISHI, M. e CHAI, S.J. Salmonellosis (Nontyphoidal). **CDC Health Information for International Travel 2014: The Yellow Book**. pp.285, 2013.
- ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.I. e WEILL, F. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. **Research in Microbiology**. v.165, p.526-530, 2014.
- JACKSON, B.R.; GRIFFIN, P.M.; COLE, D.; WALSH, K.A. e CHAI, S.J. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food Commodities, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases**. v.19, p.1239-1244, 2013.

- JONES, B.D.; GHORI, N. e FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **The Journal of Experimental Medicine**. v.180, p.15-23, 1994.
- KAGAMBÈGA, A.; LIENEMANN, T.; AULU, L.; TRAORÉ, A.S.; BARRO, N.; SIITONEN, A. e HAUKKA, K. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human *Salmonella* isolates. **BMC Microbiology**. v.13, p.1-9, 2013.
- KEESTRA, A.M.; GODINEZ, I.; XAVIER, M.N.; WINTER, M.G.; WINTER, S.E.; TSOLIS, R.M. e BÄUMLER, A.J. Early MyD88-dependent induction of interleukin-17A expression during *Salmonella colitis*. **Infection and Immunity**. v.79, p.3131-3140, 2011.
- KENT, T.H.; FORMAL, S.B. e LABREC, E.H. *Salmonella* gastroenteritis in rhesus monkeys. **Archives of Pathology**. v. 82, p.272-279, 1966.
- KHANAM, F.; SAYEED, M.A.; CHOUDHURY, F.K.; SHEIKH, A.; AHMED, D.; GOSWAMI, D.; HOSSAIN, M.L.; BROOKS, A.; CALDERWOOD, S.B.; CHARLES, R.C.; CRAVIOTO, A.; RYAN, E.T. e QADRI, F. Typhoid Fever in Young Children in Bangladesh: Clinical Findings, Antibiotic Susceptibility Pattern and Immune Responses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.9, e0003619, 2015.
- KINGSLEY, R.A.; HUMPHRIES, A.D.; WEENING, E.H.; DE ZOETE, M.R.; WINTER, S.; PAPACONSTANTINOPOULOU, A.; DOUGAN, G. e BÄUMLER, A.J. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. **Infection and Immunity**. v.71, p.629-640, 2003.
- KRAUS, M.D.; AMATYA, B. e KIMULA, Y. Histopathology of typhoid enteritis: morphologic and immunophenotypic findings. **Modern Pathology**. v.12, p.949-955, 1999.
- KUO, H.C.; LAUDERDALE, T.L.; LO, D.Y.; CHEN, C.L.; CHEN, P.C.; LIANG, S.Y.; KUO, J.C.; LIAO, Y.S.; LIAO, C.H.; TSAO, C.S., e CHIOU, C.S. An association of genotypes and antimicrobial resistance patterns among *Salmonella* isolates from pigs and humans in Taiwan. **PloS One**. v.9, p.e95772, 2014.
- LAWHON, S.D.; KHARE, S.; ROSSETTI, C.A.; EVERTS, R.E.; GALINDO, C.L.; LUCIANO, S.A.; FIGUEIREDO, J.F.; NUNES, J.E.; GULL, T. e DAVIDSON, G.S. Role of SPI-1 secreted effectors in acute bovine response to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: a systems biology analysis approach. **PLoS One**. v.6, p.e26869, 2011.
- LAWLEY, T.D.; BOULEY, D.M.; HOY, Y.E.; GERKE, C.; RELMAN, D.A. e MONACK, D.M. Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. **Infection and Immunity**. v.76, p.403-416, 2008.
- LEE, C.A.; SILVA, M.; SIBER, A.M.; KELLY, A.J.; GALYOV, E. e MCCORMICK, B.A. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.97, p.12283-12288, 2000.

LEONARD, J.; MARSHALL, J.K. e MOAYYEDI, P. Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. **American Journal of Gastroenterology**. v.102, p.2047-2056, 2007.

LIU, J.Z.; JELLBAUER, S.; POE, A.J.; TON, V.; PESCIAROLI, M.; KEHL-FIE, T.E.; RESTREPO, N.A.; HOSKING, M.P.; EDWARDS, R.A. e BATTISTONI, A.. Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances *Salmonella* growth in the inflamed gut. **Cell Host & Microbe**. v.11, p.227-239, 2012.

LIVAK, J. e SCHMITTGEN, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($-\Delta\Delta C(T)$) method. **Methods**. v.25, p.402-408, 2001.

LYNCH, M.; TAUXE, R.V. e HEDBERG, C.W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. **Epidemiology and Infection**. v.137, p.307-315, 2009.

LYONS, S.; WANG, L.; CASANOVA, J.E.; SITARAMAN, S.V.; MERLIN, D. e GEWIRTZ, A.T. *Salmonella* typhimurium transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. **Journal of Cell Science**. v.117, p.5771-5780, 2004.

MAJOWICZ, S.E; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. e INTERNATIONAL COLLABORATION ON ENTERIC DISEASE 'BURDEN OF ILLNESS' STUDIES. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**. v.50, p.882-889, 2010.

MARIN, C.; INGRESA-CAPACCIONI, S.; GONZÁLEZ-BODI, S.; MARCO-JIMÉNEZ, F. e VEGA, S., 2013. Free-living turtles are a reservoir for *Salmonella* but not for *Campylobacter*. **PloS One**. v.8, p.e72350, 2013.

MATHUR, R.; OH, H.; ZHANG, D.; PARK, S.; SEO, J.; KOBLANSKY, A.; HAYDEN, M.S. e GHOSH, S. A mouse model of *Salmonella* typhi infection. **Cell**. v.151, p.590-602, 2012.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K.E.; CLIFTON, S.W.; LATREILLE, P.; PORWOLLIK, S.; SABO, A.; MEYER, R.; BIERI, T.; OZERSKY, P. e MCLELLAN, M. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. **Nature Genetics**. v.36, p.1268-1274, 2004.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K.E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S.W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M. e DU, F. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**. v.413, p.852-856, 2001.

MCGOVERN, V.J. e SLAVUTIN, L.J. Pathology of *Salmonella* colitis. **American Journal of Surgical Pathology**. v.3, p.483-490, 1979.

MIAN, M.F.; PEK, E.A.; CHENOWETH, M.J. e ASHKAR, A.A. Humanized mice are susceptible to *Salmonella* typhi infection. **Cellular & Molecular Immunology**. v.8, p.83-87, 2011

MILLEDGE, J.; CALIS, J.C.; GRAHAM, S.M.; PHIRI, A.; WILSON, L.K.; SOKO, D.; MBVWINJI, M.; WALSH, A.L.; ROGERSON, S.R. e MOLYNEUX, M.E. Aetiology of neonatal sepsis in Blantyre, Malawi: 1996–2001. **Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health**. v.25, p.101-110, 2005.

MILLS, D.M.; BAJAJ, V. e LEE, C.A. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. **Molecular Microbiology**. v.15, p.749-759, 1995.

MOLYNEUX, E.M.; MANKHAMBO, L.A.; PHIRI, A.; GRAHAM, S.M.; FORSYTH, H.; PHIRI, A.; WALSH, A.L.; WILSON, L.K. e MOLYNEUX, M.E. The outcome of non-typhoidal *Salmonella* meningitis in Malawian children, 1997–2006. **Annals of Tropical Paediatrics: International Child Health**. v.29, p.13-22, 2009.

MONACK, D.M.; BOULEY, D.M. e FALKOW, S. *Salmonella* typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. **Journal of Experimental Medicine**. v.199, p.231-241, 2004.

MÜLLER, A.J.; HOFFMANN, C.; GALLE, M.; VAN DEN BROEKE, A.; HEIKENWALDER, M.; FALTER, L.; MISSELWITZ, B.; KREMER, M.; BEYAERT, R. e HARDT, W. The *S. Typhimurium* effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. **Cell Host & Microbe**. v.6, p.125-136, 2009.

MURASE, T.; YAMADA, M.; MUTO, T.; MATSUSHIMA, A. e YAMAI, S. Fecal excretion of *Salmonella enterica* serovar typhimurium following a food-borne outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p.3495-3497, 2000.

O'BRIEN, A.D. Innate resistance of mice to *Salmonella* typhi infection. **Infection and Immunity**. v.38, p.948-952, 1982.

O'BRIEN, I. e GIBSON, F. The structure of enterochelin and related 2, 3-dihydroxy-N-benzoyne conjugates from *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. v.215, p.393-402, 1970.

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y. e NAKAYA, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**. v.98, p.694–702, 1990.

OKORO, C.K.; KINGSLEY, R.A.; CONNOR, T.R.; HARRIS, S.R.; PARRY, C.M.; AL-MASHHADANI, M.N.; KARIUKI, S.; MSEFULA, C.L.; GORDON, M.A.; E DE PINNA, E.; WAIN, J.; HEYDERMAN, R.S.; OBARO, S.; ALONSO, P.L.; MANDOMANDO, I.; MACLENNAN, C.A.; TAPIA, M.D.; LEVINE, M.M.; TENNANT, S.M.; PARKHILL, J. e DOUGAN, G. Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. **Nature Genetics**. v.44, p.1215-1221, 2012.

OKORO, C.K.; BARQUIST, L.; CONNOR, T.R.; HARRIS, S.R.; CLARE, S.; STEVENS, M.P.; ARENDS, M.J.; HALE, C.; KANE, L.; PICKARD, D.J.; HILL, J.; HARCOURT, K.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G. e KINGSLEY, R.A. Signatures of adaptation in human invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 populations from sub-Saharan Africa. **PLoS**

Neglected Tropical Disease. v.9, p.e0003611, 2015.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M. e ALMEIDA, R.A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens & Disease.** v. 2, p.115-129, 2005.

PAIXÃO, T.A.; ROUX, C.M.; DEN HARTIGH, A.B.; SANKARAN-WALTERS, S.; DANDEKAR, S.; SANTOS, R.L. e TSOLIS, R.M. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the typeIV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. **Infection and Immunity.** v.77, p.4197–4208, 2009.

PARRY, C.M.; HIEN, T.T.; DOUGAN, G.; WHITE, N.J. e FARRAR, J.J. Typhoid fever. **New England Journal of Medicine.** v.347, p.1770-1782, 2002.

PARRY, C.M.; THOMPSON, C.; VINH, H.; CHINH, N.T.; HO, V.A.; HIEN, T.T.; WAIN, J.; FARRAR, J.J. e BAKER, S. Risk factors for the development of severe typhoid fever in Vietnam. **BMC Infectious Diseases.** v.14, p.73, 2014.

POLLACK, J.R. e NEILANDS, J. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella* Typhimurium. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v.38, p.989-992, 1970.

POWELL, C.J.; DESETT, C.R.; LOWENTHAL, J.P. e BERMAN, S. The effect of adding iron to mucin on the enhancement of virulence for mice of *Salmonella* typhi strain TY 2. **Journal of Biological Standardization.** v.8, p.79-85,1980.

RAFFATELLU, M. e BÄUMLER, A.J. *Salmonella*'s iron armor for battling the host and its microbiota. **Gut Microbes.** v.1, p.70-72, 2010.

RAFFATELLU, M.; GEORGE, M.D.; AKIYAMA, Y.; HORNSBY, M.J.; NUCCIO, S.; PAIXAO, T.A.; BUTLER, B.P.; CHU, H.; SANTOS, R.L. e BERGER, T. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. **Cell Host & Microbe.** v.5, p.476-486, 2009.

RAFFATELLU, M.; SANTOS, R.L.; VERHOEVEN, D.E.; GEORGE, M.D.; WILSON, R.P.; WINTER, S.E.; GODINEZ, I.; SANKARAN, S.; PAIXAO, T.A. e GORDON, M.A. Simian immunodeficiency virus–induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. **Nature Medicine.** v.14, p.421-428, 2008.

RAFFATELLU, M.; CHESSA, D.; WILSON, R.P.; DUSOLD, R.; RUBINO, S. e BÄUMLER, A.J. The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. **Infection and Immunity.** v.73, p.3367-3374, 2005.

RAFFATELLU, M.; CHESSA, D.; WILSON, R.P.; TUKEL, C.; AKCELIK, M. e BÄUMLER, A.J. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. **Infection and Immunity.** v.74, p.19-27, 2006.

RAFFATELLU, M.; SANTOS, R.L.; CHESSA, D.; WILSON, R.P.; WINTER, S.E.; ROSSETTI, C.A.; LAWHON, S.D.; CHU, H.; LAU, TSANG; BEVINS, C.L.; ADAMS, L.A.

e BÄUMLER, A.J. The capsule encoding the *viaB* locus reduces interleukin-17 expression and mucosal innate responses in the bovine intestinal mucosa during infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi. **Infection and Immunity**. v.75, p.4342–4350, 2007.

RAFFATELLU, M.; WILSON, R.P.; CHESSA, D.; ANDREWS-POLYMENIS, H.; TRAN, Q.T.; LAWHON, S.; KHARE, S.; ADAMS, L.G. e BÄUMLER, A.J. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**. v.73, p.146-154, 2005a.

RAYMOND, K.N.; DERTZ, E.A. e KIM, S.S. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.100, p.3584-3588, 2003.

RIBEIRO, M.G.; FERNANDES, M.C.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K.; PINTO, J.P.A.N. e BORGES, A.S. Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, p.155-160, 2010.

RINGS, D.M. Salmonellosis in calves. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**. v.1, p.529-539, 1985.

ROUX, C.M.; BUTLER, B.P.; CHAU, J.Y.; PAIXAO, T.A.; CHEUNG, K.W.; SANTOS, R.L.; LUCKHART, S. e TSOLIS, R.M. Both hemolytic anemia and malaria parasite-specific factors increase susceptibility to Nontyphoidal *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in mice. **Infection and Immunity**. v.78, p.1520-1527, 2010.

SANTOS, R.L. e BÄUMLER, A.J. Cell tropism of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**. v.294, p.225-233, 2004.

SANTOS, R.L.; RAFFATELLU, M.; BEVINS, C.L.; ADAMS, L.G.; TÜKEL, Ç.; TSOLIS, R.M. e BÄUMLER, A.J. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. **Trends in Microbiology**. v.17, p.498-506, 2009.

SANTOS, R.L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.M.; KINGSLEY, R.A.; ADAMS, L.G. e BÄUMLER, A.J. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. **Microbes and Infection**. v.3, p.1335-1344, 2001a.

SANTOS, R.L. Pathobiology of *Salmonella*, intestinal microbiota, and the host innate immune response. **Frontiers in Immunology**. v. 5, 2014.

SANTOS, R.L.; ALMEIDA, A.P.; XAVIER, M.N.; PAIXAO, T.A.; WILSON, R.P.; DANDEKAR, S.; RAFFATELLU, M. e BÄUMLER, A.J. Enteric pathology and *Salmonella*-induced cell death in healthy and SIV-infected rhesus macaques. **Veterinary Pathology**. v.48, p.933-941, 2011.

SANTOS, R.L.; SCHOFFELMEER, J.A.; TSOLIS, R.M.; GUTIERREZ-PABELLO, J.A.; BÄUMLER, A.J. e ADAMS, L.G. *Salmonella* serotype Typhimurium infection of bovine Peyer's patches down-regulates plasma membrane calcium-transporting ATPase expression. **Journal of Infectious Diseases**. v.186, p.372-378, 2002c.

SANTOS, R. L.; TSOLIS, R. M.; BAUMLER, A. J. e ADAMS, L. G. Hematologic and serum biochemical changes in *Salmonella* ser Typhimurium-infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p.1145-1150, 2002a.

SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; ZHANG, S.; FICHT, T.A.; BÄUMLER, A.J. e ADAMS, L.G. *Salmonella*-induced cell death is not required for enteritis in calves. **Infection and Immunity**. v.69, p.4610-4617, 2001b.

SANTOS, R.L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J. e ADAMS, L.G. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella* typhimurium infection in neonatal calves. **Veterinary Pathology**. v.39, p.200-215, 2002b.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L. e GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**. v.17, p.7-15, 2011.

SCHMIEGER, H. Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. **Molecular Genetics and Genomics**. v.119, p.75–88, 1972.

SEGURA, I.; CASADESÚS, J. e RAMOS-MORALES, F. Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. **Journal of Microbiology Methods**. v.56, p.83-91, 2004.

SHARMA, A. e QADRI, A. Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.101, p.17492-17497, 2004.

SHEA, J.E.; HENSEL, M.; GLEESON, C. e HOLDEN, D.W. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.2593-2597, 1996.

SPEES, A.M.; WANGDI, T.; LOPEZ, C.A.; KINGSBURY, D.D.; XAVIER, M.N.; WINTER, S.E.; TSOLIS, R.M. e BÄUMLER, A.J. Streptomycin-induced inflammation enhances *Escherichia coli* gut colonization through nitrate respiration. **Mbio**. v.4, p.e00430-13, 2013.

STECHER, B.; ROBBIANI, R.; WALKER, A.W.; WESTENDORF, A.M.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; CHAFFRON, S.; MACPHERSON, A.J.; BUER, J. e PARKHILL, J. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. **PLoS Biology**. v.5, p.e244, 2007.

STECHER, B.; MACPHERSON, A.J.; HAPFELMEIER, S.; KREMER, M.; STALLMACH, T. e HARDT, W.D. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. **Infection and Immunity**. v.73, p.3228-3241, 2005.

STOJILJKOVIC, I.; BÄUMLER, A.J. e HEFFRON, F. Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*: nucleotide sequence, protein expression, and mutational analysis of

the *cchAcchBeutEeutJeutGeutH* gene cluster. **Journal of Bacteriology**. v.177, p.1357–1366, 1995.

THIENNIMITR, P.; WINTER, S.E.; WINTER, M.G.; XAVIER, M.N.; TOLSTIKOV, V.; HUSEBY, D.L.; STERZENBACH, T.; TSOLIS, R.M.; ROTH, J.R. e BÄUMLER, A.J. Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.108, p.17480-17485, 2011.

TSOLIS, R.M.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A. e BÄUMLER, A.J. Contribution of *Salmonella* typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. **Infection and Immunity**. v.67, p.4879-4885, 1999.

TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J.; HEFFRON, F. e STOJILJKOVIC, I. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella* Typhimurium in the mouse. **Infection and Immunity**. v.64, p.4549-4556, 1996.

TSOLIS, R.M.; XAVIER, M.N.; SANTOS, R.L. e BÄUMLER, A.J. How to become a top model: impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. **Infection and Immunity**. v.79, p.1806-1814, 2011.

WANGDI, T.; LEE, C.; SPEES, A.M.; YU, C.; KINGSBURY, D.D.; WINTER, S.E.; HASTEY, C.J.; WILSON, R.P.; HEINRICH, V. e BÄUMLER, A.J. The Vi capsular polysaccharide enables *Salmonella enterica* serovar Typhi to evade microbe-guided neutrophil chemotaxis. **PLoS Pathogens**. v.10, p.e1004306, 2014.

WILSON, R.P.; RAFFATELLU, M.; CHESSA, D.; WINTER, S.E.; TÜKEL, Ç. e BÄUMLER, A.J. The Vi- capsule prevents Toll- like receptor 4 recognition of *Salmonella*. **Cellular Microbiology**. v.10, p.876-890, 2008.

WINTER, S.E.; RAFFATELLU, M.; WILSON, R.P.; RUSSMANN, H. e BAUMLER, A.J. The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. **Cellular Microbiology**. v.10, p.247–261, 2008.

WINTER, S.E.; THIENNIMITR, P.; NUCCIO, S.P.; HANEDA, T.; WINTER, M.G.; WILSON, R.P.; RUSSELL, J.M.; HENRY, T.; TRAN, Q.T.; LAWHON, S.D.; GOMEZ, G.; BEVINS, C.L.; RÜSSMANN, H.; MONACK, D.M.; ADAMS, L.G. e BÄUMLER, A.J. Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection. **Infection and Immunity**. v.77, p.1904–1916, 2009a.

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. e TSOLIS, R.M. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**. v.467, p.426-429, 2010.

WINTER, S.E.; WINTER, M.G.; POON, V.; KEESTRA, A.M.; STERZENBACH, T.; FABER, F.; COSTA, L.F.; CASSOU, F.; COSTA, E.A.; ALVES, G.E.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. e BÄUMLER, A.J. *Salmonella enterica* serovar Typhi conceals the invasion

associated type three secretion system from the innate immune system by gene regulation. **Plos Pathogens**. e10: e1004207, 2014.

WINTER, S.E.; WINTER, M.G.; THIENNIMITR, P.; GERRIETS, V.A.; NUCCIO, S.P.; RÜSSMANN, H. e BÄUMLER, A.J. The TviA auxiliary protein renders the *Salmonella enterica* serotype Typhi RcsB regulon responsive to changes in osmolarity. **Molecular Microbiology**. v.74, p.175–193, 2009b.

WRIGHT, J.G.; TENGELSEN, L.A.; SMITH, K.E.; BENDER, J.B.; FRANK, R.K.; GRENDON, J.H.; RICE, D.H.; THIESSEN, A.M.; GILBERTSON, C.J.; SIVAPALASINGAM, S.; BARRETT, T.J.; BESSER, T.E.; HANCOCK, D.D. e ANGULO, F.J. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium in four animal facilities. **Emerging Infectious Diseases**. v.11, p.1235-1241, 2005.

ZHANG, S.; SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; STENDER, S.; HARDT, W.D.; BÄUMLER, A.J. e ADAMS, L.G. The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. **Infection and Immunity**. v.70, p.3843-3855, 2002.

ANEXO A

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Salmonellosis in cattle: Advantages of being an experimental model

Luciana F. Costa^a, Tatiane A. Paixão^a, Renée M. Tsohis^b, Andreas J. Bäumlér^b, Renato L. Santos^{c,*}^a Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Av., Antonio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil^b Department of Medical Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of California at Davis, One Shields Av., Davis, CA, USA^c Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av., Antonio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2012

Accepted 11 March 2012

Keywords:

Cattle

Salmonella

Typhimurium

Dublin

Salmonellosis

ABSTRACT

Salmonellosis is an important disease of cattle caused predominantly by *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium (*S. typhimurium*) and Dublin (*S. dublin*). *S. typhimurium* causes acute enteritis and exudative diarrhea in calves. In addition to enteric disease, *S. dublin* can cause systemic infections, and may cause abortion in pregnant cows. Calves are considered a relevant model for non-typhoidal salmonellosis in humans. Experimental oral infections or inoculation of ligated ileal loops in calves have been extensively studied recently. This article reviews relevant published results regarding bovine salmonellosis as a natural disease or as an animal model.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Salmonella spp. are gram-negative bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family. These bacteria have a broad host range, and are associated with important losses in animal production as well as with public health implications due to their role as food-borne and/or zoonotic pathogens. There are more than 2500 known serotypes that belong to two species, namely *Salmonella enterica* (with more than 2400 serotypes) and *Salmonella bongori* (20 serotypes). Infection of warm-blooded animal species is caused by several serotypes of *S. enterica* subspecies *enterica* (Brenner et al., 2000). Some individual *Salmonella* serotypes have a predilection for a particular host, but they may infect and eventually cause disease in other host species. These host-restricted serotypes include Choleraesuis (Chiu et al., 2004) and Dublin (Hughes et al., 1971; Fang and Fierer, 1991) that preferentially infect pigs and cattle, respectively. Other serotypes such as Typhimurium and Enteritidis can infect a wide range of host species (Hohmann, 2001). Finally, some *Salmonella* serotypes are host-specific. For instance, serotypes Typhi and Paratyphi infect only humans, causing typhoid fever, whereas serotype Gallinarum infects chickens (Baumlér et al., 1998; Crump et al., 2004).

While several serotypes can infect cattle, bovine salmonellosis is caused predominantly by *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium (*S. typhimurium*) and Dublin (*S. dublin*) (Richardson, 1975; Rings, 1985). Although these two serotypes can cause enteric disease in cattle, there is a tendency for different clinical manifes-

tations. *S. typhimurium* is often associated with enteritis that usually affects young calves, resulting in marked acute diarrhea (Rankin and Taylor, 1966). Conversely, *S. dublin* is often associated with systemic infections that may result in asymptomatic shedding or in abortion in pregnant cows, clinical features that do not necessarily occur together with diarrhea (Richardson, 1975; Carrique-Mas et al., 2010), whereas abortion is not a common clinical manifestation of *S. typhimurium* infections (Carrique-Mas et al., 2010). Importantly, cattle are one of the most common sources of infection for human salmonellosis, which is a major public health issue since *Salmonella* is one of the most important pathogens associated with food-borne infections worldwide (Tauxes, 1997; Flint et al., 2005). Importantly, *Salmonella* is often isolated from healthy cattle in slaughterhouses (Bosilevac et al., 2009). Natural infections not always trigger protective immunity, and therefore re-infections may occur (Dougan et al., 2011).

Infection of mice with non-typhoidal *Salmonella*, particularly in the case of *S. typhimurium*, results in a systemic disease that mimics typhoid fever in humans (Santos et al., 2001c). Conversely, infection of calves with *S. typhimurium* induces an enteric disease that parallels clinical symptoms and pathological changes that are observed in enteric salmonellosis caused by non-typhoidal *Salmonella* in humans (Santos et al., 2001c). Due to limitations of working with a large animal model and the advantages of working with a laboratory species, a streptomycin-treated mouse model of infection that results in enteric inflammation in mice was developed (Barthel et al., 2003). This model is based on a marked depletion of the intestinal flora prior to inoculation with *Salmonella*, which was previously known to change the pattern of the host response (Nardi et al., 1989). While this widely-used mouse model

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 2239; fax: +55 31 3409 2230.

E-mail address: rsantos@vet.ufmg.br (R.L. Santos).

for *Salmonella*-induced enteric disease has the advantages associated with the well-characterized mouse genetics, calves are a suitable and extensively used model for human enteric salmonellosis. Experimental infections in cattle have explored two routes of infections, namely oral infections and inoculation of ileal ligated loops (Hall and Jones, 1977; Smith et al., 1979; Wallis et al., 1995; Watson et al., 1995, 1998; Bolton et al., 1999). Therefore, a large amount of knowledge has been gained by exploring cattle as a model for human disease, which has a major positive impact on our knowledge of the disease in cattle. In this review the more relevant aspects of *Salmonella* pathogenesis in cattle are discussed in light of published results generated using the cattle as a model for human enteric salmonellosis.

2. Natural *Salmonella* infection in cattle

Salmonellosis in cattle is most commonly caused by *S. dublin* and *S. typhimurium*, but other serotypes are also capable of causing infection in cattle as well (Richardson, 1975). *S. typhimurium* most frequently affects calves at less than 2 months of age (Smith et al., 1979; Younis et al., 2009). Clinical signs of salmonellosis include fever, anorexia, prominent diarrhea, and dehydration, which are secondary to acute necrotizing enteritis. Lethality is inversely proportional to the age of the infected calf (Smith et al., 1979). Feces tend to be watery, with variable amounts of mucus, fragments of the intestinal mucosa or blood clots (Wray et al., 1987).

S. dublin is highly adapted to cattle, affecting both young and adult animals. In young calves, *S. dublin* causes disease that is clinically indistinguishable from *S. typhimurium* and is characterized primarily by diarrhea. However, *S. dublin* has a much higher potential for systemic dissemination, which can result in meningoencephalitis, polyarthritis or pneumonia, occasionally in the absence of diarrhea (Rings, 1985). In adult cattle, infection with this serotype is common, and it can be asymptomatic or characterized by abortion as the only detectable clinical sign (Hall et al., 1979). *S. dublin* infection can also be associated with fever, reduced milk production, and mild to moderate diarrhea (Wray and Sojka, 1981). Individual animals may shed *S. dublin* intermittently leading to sporadic or repeated outbreaks of disease in a given herd (Wray et al., 1987; Nielsen et al., 2004).

3. Bovine model for *Salmonella*-induced enteritis

Pioneering studies on experimental *Salmonella* infection in cattle were performed by oral challenge. Orally infected calves develop clinical signs that closely resemble those observed during natural infections, which are characterized by prominent exudative diarrhea, anorexia, fever, dehydration, and prostration. Usually, oral inoculations with 10^4 – 10^7 colony forming units (CFU) cause transient diarrhea that persists for 2–8 days, while doses between 10^8 and 10^{11} CFU can result in lethal infections (Smith et al., 1979).

In the 1990s, an ileal ligated loop model was adapted to cattle from other species. The calf is anesthetized, portions of the ileum are individually ligated, and selected *Salmonella* strains are inoculated directly into the intestinal lumen of the ligated loop (Wallis et al., 1995). This model allow a precise evaluation of early pathologic changes such as recruitment of neutrophils (Fig. 1), and fluid secretion that can be directly assessed by measuring the amount of fluid that accumulates in the lumen of the ligated loop (Fig. 2), which is a surrogate of diarrhea (Santos et al., 2001b, 2002a). In comparison to oral infection, the ligated loop model allows inoculation of several strains in one single calf, thus drastically reducing the number of animals required for a given experiment. Importantly, the lesions observed in this model have kinetics that are

similar to those observed as a result of oral infections (Zhang et al., 2002). However, the ligated loop model is suitable only for studying responses at early time points post infection, as the inoculated loops are removed and the animal is immediately euthanized at the end of the surgical procedure (Santos et al., 2002a).

Calves infected orally with *S. typhimurium* have a short incubation period, developing prominent exudative diarrhea within 48 h post infection. In some cases, infected calves develop anorexia and central nervous system depression, and the disease has a peracute course with death within 24 h post infection (Smith et al., 1979; Tsolis et al., 1999). Usually, there is a fibrinopurulent necrotizing enteritis characterized by severe diffuse neutrophilic infiltrate and pseudomembrane formation on the surface of ileum and colon (Tsolis et al., 1999). Lymphoid depletion is often observed in mesenteric lymph nodes (Wray and Sojka, 1978; Tsolis et al., 1999). Oral inoculation of calves with 10^{10} CFU of *S. typhimurium* results in diarrhea with severe dehydration, mild to moderate hemoconcentration, hypoglycemia, metabolic acidosis, and azotemia, associated with protein loss due to fibrinonecrotic enteritis, which explains the decrease in total plasma protein and albumin concentrations in spite of hemoconcentration (Santos et al., 2002b). Increased fibrinogen concentration, which is a marker for acute-phase responses in cattle, indicates acute inflammatory disease. This massive neutrophilic infiltration in the intestinal mucosa results in hematological changes that include marked neutropenia, associated with a regenerative response with increased numbers of band neutrophils and metamyelocytes at 48 h post infection (Santos et al., 2002b).

The kinetics of invasion of the intestinal mucosa by *S. typhimurium* have been characterized in detail in ligated ileal loops by electron microscopy (Santos et al., 2002a) and immunohistochemistry (Reis et al., 2003). *Salmonella* readily invades M cells on the Peyer's patches as early as 15 min post infection, but it is also capable of invading enterocytes and even goblet cells (Santos et al., 2002a; Santos and Bäumlner, 2004). At 1 h post infection *S. typhimurium* is already found in the lamina propria, mostly intracellularly in macrophages (Santos et al., 2002a; Santos and Bäumlner, 2004).

S. typhimurium elicits a very strong neutrophilic influx in the intestinal mucosa that results in loss of epithelial integrity and effusion of a protein-rich exudate into the intestinal lumen, which is a key event in the pathogenesis of *Salmonella*-induced diarrhea (Santos et al., 2002a). Indeed, calves with leukocyte adhesion deficiency (BLAD) do not develop a neutrophilic infiltration in response to *Salmonella* infection, and in these calves, there is less

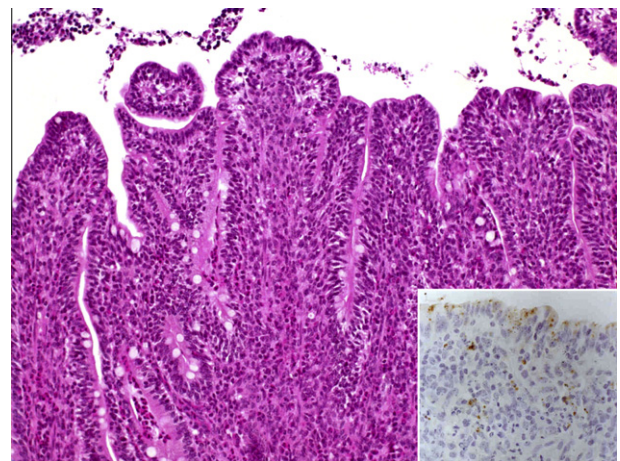


Fig. 1. Acute neutrophilic enteritis at 5 h post infection with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium; hematoxylin and eosin. Detail: immunolabeling of *S. typhimurium* in the intestinal mucosa with intense invasion of the lamina propria.

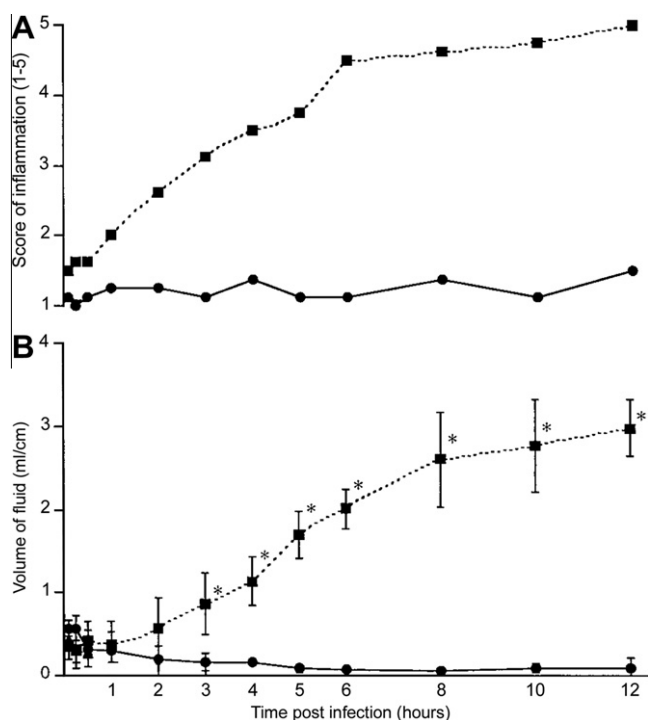


Fig. 2. Score of inflammation (A) and volume of fluid accumulation (B) in bovine ileal ligated loops throughout the time course of infection with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (squares and dotted line), compared to uninfected control loops (circles and solid line). *Statistically different from uninfected control ($P < 0.05$). Adapted from Santos et al., 2001b.

tissue damage, reduced fluid accumulation in the intestinal lumen, and more systemic dissemination of bacteria when compared to normal calves (Nunes et al., 2010). Importantly, intestinal infection with *S. typhimurium* results in strong pro-inflammatory cytokine response and consequently a marked acute inflammatory reaction that could be interpreted as detrimental to *Salmonella*. However, this acute host response is also associated with increase in antimicrobial mechanisms that suppress the normal intestinal microbiota, whereas *Salmonella* is capable of resisting this host antimicrobial response, and therefore exploit inflammation to out-compete the intestinal microbiota, favoring a massive shedding and more efficient transmission (Santos et al., 2009). *Salmonella* adaptation to the inflamed intestinal environment was further characterized in a recent study, which elucidated how tetrathionate enrichment provides a benefit during infection. Tetrathionate broth medium has been widely used for enrichment and isolation of *Salmonella* since the 1920s. Prior to use, tetrathionate is generated in the broth through oxidation of thiosulphate by a strong oxidant (iodine). As a protective mechanism, the intestinal mucosa converts hydrogen sulfide to thiosulphate. As a result of intestinal inflammation, and the consequent generation of reactive oxygen species, oxidation of thiosulphate leads to generation of tetrathionate, mimicking the enrichment that occurs in vitro when *Salmonella* is cultured in tetrathionate broth. As a result, this provides a growth advantage for *S. typhimurium* over the competing microbiota in the lumen of the inflamed gut (Winter et al., 2010).

The bovine model has been a powerful tool for identifying the role of *Salmonella* virulence factors required for enteropathogenesis (Table 1). For instance, two key events during *S. typhimurium* infection is its ability to invade intestinal epithelial cells and survive within macrophages, which are dependent on *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPI) 1 and 2, respectively (Cirillo et al., 1998; Wong et al., 1998; Wood et al., 1998; Galan, 1999; Blanc-Potard et al., 1999). SPI-1 encodes the invasion-associated type III

secretion system (T3SS-1) that translocates effector proteins into the host cell cytosol and induces actin rearrangements, resulting in bacterial invasion (Galan, 1999). SPI-2 encodes a second type III secretion system (T3SS-2), required for intracellular survival in macrophages (Cirillo et al., 1998). SPI-1 is absolutely required for *Salmonella*-induced enteritis in cattle (Tsolis et al., 1999). Oral infection with a *Salmonella* mutant strain lacking *invH* a SPI-1 gene, results in reduction of the severity of enteritis in calves (Watson et al., 1998). Mutations in *hilaA*, that encodes an activator of SPI-1 (Bajaj et al., 1995) and *prgH*, that encodes a T3SS-1 component (Kubori et al., 1998) markedly reduces the intensity of diarrhea and intestinal lesions (Tsolis et al., 1999). However, while SPI-2 plays a crucial role in virulence during systemic infection caused by *S. typhimurium* in mice (Shea et al., 1999) and *S. dublin* in calves (Libby et al., 1997), it is a minor contributor to diarrhea and inflammation in calves infected by *S. typhimurium* (Tsolis et al., 1999).

Salmonella effector proteins SopA, SopB, SopD, SopE2, and SipA are translocated into the host cell cytosol through the T3SS-1, acting in concert to elicit neutrophil influx and fluid accumulation in bovine ileal loops inoculated with *S. typhimurium* (Zhang et al., 2002). The mechanism by which these effectors contribute to fluid accumulation may be related to the ability of these proteins to stimulate an inflammatory response. SipA and SopD elicit production of chemoattractants that promote transepithelial neutrophil migration in a tissue culture model (Lee et al., 2000). SopB and SopE2 interfere with intracellular signaling pathways that may result in the expression of proinflammatory cytokines and chemoattractants for neutrophils (Mirolid et al., 2001). *S. typhimurium* infection induces moderate changes in gene expression profile at 30 min post infection, which increases over the time-course of infection up to 4 h post inoculation (Adams et al., 2011). Lawhon et al. (2011) compared gene expression profile in bovine ligated ileal loops challenged with wild type or a $\Delta sipAsopABDE2$ mutant of *S. typhimurium* that lacks effector proteins required for induction of chemokine expression, neutrophilic infiltration, and diarrhea. These authors demonstrated that *S. typhimurium* induces marked changes in the gene expression profile, with a strong proinflammatory response, characterized particularly by an increased expression of CCL2, CCL8, CXCL6, IL8, CXCL9, CXCL10, and CXCL11. As expected, the mutant strain lacking all T3SS-1 effector proteins required for enteropathogenesis induces a much milder host response (Lawhon et al., 2011).

S. typhimurium induces cell death in cultured bovine macrophages, which depends on an intact T3SS-1 of the pathogen and caspase-1 from the host (Santos et al., 2001a). It has recently been demonstrated that flagellin, which is promiscuously secreted through the T3SS-1, triggers host cell death through its interaction with the cytosolic pathogen molecular pattern receptor Ipaf, activating caspase-1 (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006). Considering that caspase 1 cleaves and activates interleukin (IL)-1 β and IL-18, this *Salmonella*-induced macrophage death is a proinflammatory mechanism, thus it has been named pyroptosis (Bergsbaken et al., 2009). However, the importance of this mechanism in vivo in cattle is still not clear (Santos et al., 2001b).

Considering that *Salmonella*-induced diarrhea is important cause of mortality in calves and that diarrhea is also an efficient route for massive shedding of the organism and environment contamination, the knowledge gained with these bovine experimental infection models has greatly improved our understanding of the pathogenesis of *Salmonella*-induced diarrhea in cattle.

4. *Salmonella* Dublin infection

S. dublin induces slightly different clinical manifestations in comparison to *S. typhimurium*. Despite the evident importance of *S. dublin*-induced enteritis in calves, there are fewer studies on

Table 1
Genes and virulence factors required for *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium and Dublin enteropathogenesis in calves.

Serotype	Gene/virulence factor	Protocol ^a	References	
Typhimurium	<i>aro</i>	OI	Smith et al. (1984), Jones et al. (1991)	
	<i>invH</i>	IL	Watson et al. (1995, 1998)	
	<i>prgH</i>	OI	Tsolis et al. (1999)	
	<i>hilA</i>	OIII	Tsolis et al. (1999), Ahmer et al. (1999)	
	<i>sirA</i>	IL	Ahmer et al. (1999)	
	<i>sipA, sopA, sopD, sopE2</i>	OI and IL	Zhang et al. (2002), Zhang et al., (2003)	
	<i>sopB</i>	OI	Tsolis et al. (1999), Zhang et al. (2002, 2003), Reis et al. (2003)	
	<i>spiB</i>	OI	Tsolis et al. (1999)	
	<i>spv</i>	OI	Tsolis et al. (1999)	
	<i>siiE, siiF</i>	OI	Morgan et al. (2004, 2007)	
	<i>fliC, fljB, flgK</i>	IL	Winter et al. (2009)	
	Dublin	<i>sseD, ssaT</i>	IL	Bispham et al. (2001)
		<i>pipA, B, D</i>	IL	Wood et al. (1998)
<i>sipB</i>		IL	Galyov et al. (1997), Jones et al. (1998), Wood et al. (2000), Pullinger et al. (2007)	
<i>sopA</i>		IL	Wood et al. (2000)	
<i>sopB</i>		IL	Galyov et al. (1997), Jones et al. (1998), Wood et al. (1998, 2000), Pullinger et al. (2007, 2010)	
<i>sopD</i>		IL	Jones et al. (1998), Pullinger et al. (2007)	
<i>spv</i>		OI	Libby et al. (1997)	
<i>barA, envZ, phoQ, ssrA, qseC, baeS, dpiB, citA</i>		IL	Pullinger et al. (2010)	
SDI-1		OI	Pullinger et al. (2008)	

^a Experimental protocol: OI – oral infection; IL – ligated ileal loop.

pathological changes caused by *S. dublin* infection (Hall and Jones, 1977). After oral infection, *S. dublin* colonizes intestinal as well as systemic sites (Hall and Jones, 1977; Paulin et al., 2002). Even at early stages of infection, *S. dublin* tends to disseminate to mesenteric lymph nodes, spleen, liver, and lungs, whereas at later stages of infection it may spread to other tissues, including placentomes in pregnant cows (Hall and Jones, 1977). Abortions are associated with replication of *S. dublin* in placentomes. *S. dublin* and *S. typhimurium* have similar kinetics of intestinal invasion, resulting in similar number of organisms within the intestinal mucosa at early stages of infection (Watson et al., 1995; Paulin et al., 2002). However, despite similar CFU numbers, *S. typhimurium* induces a more intense secretory and inflammatory response in the intestine when compared to *S. dublin* at 2 h (Paulin et al., 2002) and 12 h post infection (Watson et al., 1998).

The bovine ileal ligated loop as well as oral infection models have also been used to study *S. dublin* virulence factors. Similarly to *S. typhimurium*, *S. dublin* express SPI-1 and SPI-5-encoded proteins that are required for the enteropathogenesis. Inoculation of a Δ *sopB* mutant into bovine ileal ligated loops elicits less inflammation than the wild type strain, although the *S. dublin* Δ *sopB* mutant strain invades the intestinal mucosa at similar levels when compared to the wild type strain (Galyov et al., 1997). A similar phenotype of the Δ *sopB* mutant has been demonstrated in *S. typhimurium* (Santos et al., 2001b; Reis et al., 2003). SopB is an inositol phosphate phosphatase that alters chloride secretion and enhances fluid accumulation into gut (Norris et al., 1998). SopA is also translocated into eukaryotic cells to promote the inflammatory response and the fluid secretion into intestine (Wood et al., 2000). In addition, *S. dublin* strains lacking genes from SPI-5 are less enteropathogenic than the wild type strain in calves but maintain the ability to cause systemic infection in murine model (Wood et al., 1998), suggesting that the SPI-5 encoded genes are important for enteropathogenesis.

Although the mechanisms that make *S. dublin* more capable of systemic dissemination than *S. typhimurium* are not known, the clinical manifestation suggests that *S. dublin* employs additional virulence mechanisms that promote systemic infection. *S. dublin* disseminates from the intestine to systemic sites via draining mesenteric lymph nodes and efferent lymphatics (Pullinger et al., 2007). Interestingly, bacteria found to be disseminating from the

gut via the efferent lymphatics appear to be free, rather than carried within cells. The *spv* (*Salmonella* plasmid virulence) locus plays an important role in systemic salmonellosis in calves infected with *S. dublin* (Libby et al., 1997). Several two-component regulatory systems that sense environmental signals are required for virulence of *S. dublin*, with some of those being required for establishment of infection at systemic sites (Pullinger et al., 2010).

S. dublin is adapted to cattle, but the mechanisms that drive host-adaptation are poorly known. However, a specific *S. dublin* genetic island, named *S. enterica* serovar Dublin island 1 (SDI-1), has been demonstrated to play a role in pathogenesis in a host dependent manner. Interestingly, SDI-1 plays no role in invasion of cultured epithelial cells, intracellular survival in macrophages, or virulence in mice, indicating that SDI-1 is likely a host-specific virulence factor for cattle (Pullinger et al., 2008).

5. Concluding remarks

Bovine salmonellosis is an extremely important disease for the cattle industry as well as in terms of public health since human salmonellosis is one of the most important food borne diseases worldwide. The emergence of multi drug resistant strains is beginning to limit treatment options. Therefore, advancing knowledge on host-pathogen interaction and pathogenesis of *Salmonella* can potentially have a positive impact on our ability to reduce the risk of both human and bovine infections. The fact that calves are an excellent model for human *Salmonella*-induced enteritis has resulted in a comparatively rapid advancement in research on *Salmonella* infections in cattle. This model can certainly contribute to future advances in the field. For instance, the calf model could be useful to understand the inflammation-adapted lifestyle of *Salmonella* and transmission.

Acknowledgements

Work in R.L.S. lab is supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil). R.L.S. has a fellowship from CNPq.

References

- Adams, L.G., Khare, S., Lawhon, S.D., Rossetti, C.A., Lewin, H.A., Lipton, M.S., Turse, J.E., Wylie, D.C., Bai, Y., Drake, K.L., 2011. Multi-comparative systems biology analysis reveals time-course biosignatures of *in vivo* bovine pathway responses to *B. melitensis*, *S. enterica* Typhimurium and *M. avium paratuberculosis*. BMC Proceedings 5, 1–8.
- Ahmer, M.M.B., Reeuwijk, J.V., Watson, P.R., Wallis, T.S., Heffron, F., 1999. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. Molecular Microbiology 31, 971–982.
- Bajaj, V., Hwang, C., 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.
- Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martínez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer, K., Rüssmann, H., Hardt, W.D., 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. Infection and Immunity 71, 2839–2858.
- Baumler, A.J., Tsoilis, R.M., Ficht, T.A., Adams, L.G., 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. Infection and Immunity 66, 4579–4587.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., Cookson, B.T., 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. Nature Reviews Microbiology 7, 99–109.
- Bispham, J., Tripathi, B.N., Watson, P.R., Wallis, T.S., 2001. *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. Infection and Immunity 69, 367–377.
- Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J., Groisman, E.A., 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. Journal of Bacteriology 181, 998–1004.
- Bolton, A.J., Osborne, M.P., Wallis, T.S., Stephen, J., 1999. Interaction of *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* with porcine and bovine terminal ileum *in vivo*. Microbiology 145, 2431–2441.
- Bosilevac, J.M., Arthur, T.M., Bono, J.L., Brichta-Harhay, D.M., Kalchayanand, N., King, D.A., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., 2009. Prevalence and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in US abattoirs that process fewer than 1000 head of cattle per day. Journal of Food Protection 72, 1272–1278.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B., 2000. *Salmonella* nomenclature. Journal of Clinical Microbiology 38, 2465–2467.
- Carrique-Mas, J.J., Willmington, J.A., Papadopolou, C., Watson, E.N., Davies, R.H., 2010. *Salmonella* infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008. Veterinary Record 167, 560–565.
- Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M., Falkow, S., 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. Molecular Microbiology 30, 175–188.
- Chiu, C.H., Su, L.H., Chu, C., 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. Clinical Microbiology Reviews 17, 311–322.
- Crump, J.A., Luby, S.P., Mintz, E.D., 2004. The global burden of typhoid fever. Bulletin of World Health Organization 82, 346–353.
- Dougan, G., John, V., Palmer, S., Mastroeni, P., 2011. Immunity to salmonellosis. Immunology Reviews 240, 196–210.
- Fang, F.C., Fierer, J., 1991. Human infection with *Salmonella dublin*. Medicine 70, 198–207.
- Flint, J.A., Van Duynhoven, Y.T., Angulo, F.J., Delong, S.M., Braun, P., Kirk, M., Scallan, E., Fitzgerald, M., Adak, G.K., Sockett, P., Ellis, A., Hall, G., Gargouri, N., Walke, H., Braa, P., 2005. Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. Clinical Infectious Diseases 41, 698–704.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., Nunez, G., 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *Salmonella*-infected macrophages. Nature Immunology 7, 576–582.
- Galan, J.E., 1999. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. Current Opinion in Microbiology 2, 46–50.
- Galyov, E.E., Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S., 1997. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. Molecular Microbiology 25, 903–912.
- Hall, G.A., Jones, P.W., 1977. A study of the pathogenesis of experimental *Salmonella dublin* abortion in cattle. Journal of Comparative Pathology 87, 53–65.
- Hall, G.A., Jones, P.W., Parsons, K.R., Chanter, N., Aitken, M.M., 1979. Studies of the virulence of *Salmonella dublin* in experimental infections of cattle and rats. British Veterinary Journal 135, 243–248.
- Hohmann, E.L., 2001. Nontyphoidal salmonellosis. Clinical Infectious Diseases 32, 263–269.
- Hughes, L.E., Gibson, E.A., Roberts, H.E., Davies, E.T., Davies, G., Sojka, W.J., 1971. Bovine salmonellosis in England and Wales. British Veterinary Journal 127, 225–238.
- Jones, M.A., Wood, M.W., Mullan, P.B., Watson, P.R., Wallis, T.S., Galyov, E.E., 1998. Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. Infection and Immunity 66, 5799–5804.
- Jones, P.W., Dougan, G., Hayward, C., Mackenzie, N., Collins, P., Chatfield, S.N., 1991. Oral vaccination of calves against experimental salmonellosis using a double *aro* mutant of *Salmonella* Typhimurium. Vaccine 9, 29–34.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E., Aizawa, S.I., 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science 280, 602–605.
- Lawhon, S.D., Khare, S., Rossetti, C.A., Everts, R.E., Galindo, C.L., Luciano, S.A., Figueiredo, J.F., Nunes, J.E.S., Gull, T., Davidson, G.S., Drakes, K.L., Garner, H.R., Lewin, H.A., Baumler, A.J., Adams, L.G., 2011. Role of SPI-1 secreted effectors in acute bovine response to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: a systems biology analysis approach. PLoS ONE 6, 1–18.
- Lee, C.A., Silva, M., Siber, A.M., Kelly, A.J., Galyov, E., McCormick, B.A., 2000. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 12283–12288.
- Libby, S.J., Adams, L.G., Ficht, T.A., Allen, C., Whitford, H.A., Buchmeier, N.A., Bossie, S., Guiney, D.G., 1997. The *spv* genes on the *Salmonella* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. Infection and Immunity 65, 1786–1792.
- Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., Aderem, A., 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. Nature Immunology 7, 569–575.
- Mirold, S., Ehrbar, K., Weissmuller, A., Prager, R., Tschape, H., Russmann, H., Hardt, W.D., 2001. *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and *sopE2*. Journal of Bacteriology 183, 2348–2358.
- Morgan, E., Bowen, A.J., Carnell, S.C., Wallis, T.S., Stevens, M.P., 2007. SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. Infection and Immunity 75, 1524–1533.
- Morgan, E., Campbell, J.D., Rowe, S.C., Bispham, J., Stevens, M.P., Bowen, A.J., Barrow, P.A., Maskell, D.J., Wallis, T.S., 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Molecular Microbiology 54, 994–1010.
- Nardi, R.M., Silva, M.E., Vieira, E.C., Bambilra, E.A., Nicoli, J.R., 1989. Intragastric infection of germfree and conventional mice with *Salmonella typhimurium*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 22, 1389–1392.
- Nielsen, L.R., Schukken, Y.H., Grohn, Y.T., Ersbøll, A.K., 2004. *Salmonella* Dublin infection in dairy cattle: risk factors for becoming a carrier. Preventive Veterinary Medicine 65, 47–62.
- Norris, F.A., Wilson, M.P., Wallis, T.S., Galyov, E.E., Majerus, P.W., 1998. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* Dublin, is an inositol phosphate phosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 14057–14059.
- Nunes, J.S., Lawhon, S.D., Rossetti, C.A., Khare, S., Figueiredo, J.F., Gull, T., Burghardt, R.C., Baumler, A.J., Tsoilis, R.M., Andrews-Polymenis, H.L., Adams, L.G., 2010. Morphologic and cytokine profile characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in calves with bovine leukocyte adhesion deficiency. Veterinary Pathology 47, 322–333.
- Paulin, S.M., Watson, P.R., Benmore, A.R., Stevens, M.P., Jones, P.W., Villarreal-Ramos, B., Wallis, T.S., 2002. Analysis of *Salmonella enterica* serotype-host specificity in calves: avirulence of *S. enterica* serotype Gallinarum correlates with bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence *in vivo*. Infection and Immunity 70, 6788–6797.
- Pullinger, G.D., van Diemen, P.M., Dziva, F., Stevens, M.P., 2010. Role of two-component sensory systems of *Salmonella enterica* serovar Dublin in the pathogenesis of systemic salmonellosis in cattle. Microbiology 156, 3108–3122.
- Pullinger, G.D., Paulin, S.M., Charleston, B., Watson, P.R., Bowen, A.J., Dziva, F., Morgan, E., Villarreal-Ramos, B., Wallis, T.S., Stevens, M.P., 2007. Systemic translocation of *Salmonella enterica* serovar Dublin in cattle occurs predominantly via efferent lymphatics in a cell-free niche and requires type III secretion system 1 (T3SS-1) but not T3SS-2. Infection and Immunity 75, 5191–5199.
- Pullinger, G.D., Dziva, F., Charleston, B., Wallis, T.S., Stevens, M.P., 2008. Identification of *Salmonella enterica* serovar Dublin-specific sequences by subtractive hybridization and analysis of their role in intestinal colonization and systemic translocation in cattle. Infection and Immunity 76, 5310–5321.
- Rankin, J.D., Taylor, R.J., 1966. The estimation of the doses of *Salmonella typhimurium* for experimental production of disease in calves. Veterinary Records 78, 706–707.
- Reis, B.P., Zhang, S., Tsoilis, R.M., Bäuml, A.J., Adams, L.G., Santos, R.L., 2003. The attenuated *sopB* mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium has the same tissue distribution and host chemokine response as the wild type in bovine Peyer's patches. Veterinary Microbiology 97, 269–277.
- Richardson, A., 1975. Outbreaks of bovine salmonellosis caused by serotypes other than *S. dublin* and *S. typhimurium*. Journal of Hygiene 74, 195–203.
- Rings, D.M., 1985. Salmonellosis in calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 1, 529–539.
- Santos, R.L., Bäuml, A.J., 2004. Cell tropism of *Salmonella enterica*. International Journal of Medical Microbiology 294, 225–233.
- Santos, R.L., Raffatellu, M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tükel, C., Tsoilis, R.M., Bäuml, A.J., 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. Trends in Microbiology 17, 498–506.
- Santos, R.L., Tsoilis, R.M., Bäuml, A.J., Smith 3rd, R., Adams, L.G., 2001a. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early *sipB*-dependent and delayed *sipB*-independent mechanisms. Infection and Immunity 69, 2293–2301.

- Santos, R.L., Tsois, R.M., Zhang, S., Ficht, T.A., Baumler, A.J., Adams, L.G., 2001b. *Salmonella*-induced cell death is not required for enteritis in calves. *Infection and Immunity* 69, 4610–4617.
- Santos, R.L., Zhang, S., Tsois, R.M., Kingsley, R.A., Adams, L.G., Baumler, A.J., 2001c. Animal models of *Salmonella* infections: gastroenteritis vs. typhoid fever. *Microbes and Infection* 3, 1335–1344.
- Santos, R.L., Zhang, S., Tsois, R.M., Baumler, A.J., 2002a. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Veterinary Pathology* 39, 200–215.
- Santos, R.L., Tsois, R.M., Baumler, A.J., Adams, L.G., 2002b. Hematologic and serum biochemical changes in *Salmonella* ser Typhimurium-infected calves. *American Journal of Veterinary Research* 63, 1145–1150.
- Shea, J.E., Beuzón, C.R., Gleeson, C., Mundy, R., Holden, D.W., 1999. Influence of the *Salmonella typhimurium* pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infection and Immunity* 67, 213–219.
- Smith, B.P., Habasha, F., Reina-Guerra, M., Hardy, A.J., 1979. Bovine salmonellosis: experimental production and characterization of the disease in calves, using oral challenge with *Salmonella* Typhimurium. *American Journal of Veterinary Research* 40, 1510–1513.
- Smith, B.P., Reina-Guerra, M., Hoiseth, S.K., Stocker, B.A., Habasha, F., Johnson, E., Merritt, F., 1984. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium as modified live vaccines for calves. *American Journal of Veterinary Research* 45, 59–66.
- Tauxes, R.V., 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases* 3, 425–434.
- Tsois, R.M., Adams, L.G., Ficht, T.A., Baumler, A.J., 1999. Contribution of *Salmonella* Typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infection and Immunity* 67, 4879–4885.
- Wallis, T.S., Paulin, S.M., Plested, J.S., Watson, P.R., Jones, P.W., 1995. The *Salmonella dublin* virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infection and Immunity* 63, 2755–2761.
- Watson, P.R., Paulin, S.M., Bland, A.P., Jones, P.W., Wallis, T.S., 1995. Characterization of intestinal invasion by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* and effect of a mutation in the *invH* gene. *Infection and Immunity* 63, 2743–2754.
- Watson, P.R., Galyov, E.E., Paulin, S., Jones, P.W., Wallis, T.S., 1998. Mutation of *invH*, but not *stn*, reduces *Salmonella*-induced enteritis in cattle. *Infection and Immunity* 66, 1432–1438.
- Winter, S.E., Thiennimitr, P., Nuccio, S.P., Haneda, T., Winter, M.G., Wilson, R.P., Russel, J.M., Henry, T., Trant, Q.T., Lawhon, S.D., Gomez, G., Bevins, C.L., Rüssmann, H., Monack, D.M., Adams, L.G., Baumler, A.J., 2009. Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection. *Infection and Immunity* 77, 1904–1916.
- 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., Tsois, R.M., Roths, J.R., Baumler, A.J., 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467, 426–429.
- Wong, K.K., McClelland, M., Stillwell, L.C., Sisk, E.C., Thruston, S.J., Saffer, J.D., 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Infection and Immunity* 66, 3365–3371.
- Wood, W.M., Jones, M.A., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S., Galyov, E.E., 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Molecular Microbiology* 29, 883–891.
- Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Siber, A.M., McCormick, B.A., Hedges, S., Rosqvist, R., Wallis, T.S., Galyov, E.E., 2000. The secreted effector protein of *Salmonella* Dublin, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cellular Microbiology* 2, 293–303.
- Wray, C., Sojka, W.J., 1978. Experimental *Salmonella* Typhimurium infection in calves. *Research in Veterinary Science* 25, 139–143.
- Wray, C., Sojka, W.J., 1981. *Salmonella* Dublin infection of calves: use of small doses to simulate natural infection on the farm. *Journal of Hygiene* 87, 501–509.
- Wray, C., Todd, N., Hinton, M.H., 1987. The epidemiology of *Salmonella typhimurium* in calves: excretion of *S. typhimurium* in faeces of calves in different management systems. *Veterinary Record* 211, 293–296.
- Younis, E.E., Ahmed, A.M., El-Khodery, S.A., Osman, S.A., El-Naker, Y.F., 2009. Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in diarrheic neonatal calves in Egypt. *Research in Veterinary Science* 87, 373–379.
- Zhang, S., Adams, L.G., Nunes, J., Khare, S., Tsois, R.M., Baumler, A.J., 2003. Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. *Infection and Immunity* 71, 4795–4803.
- Zhang, S., Santos, R.L., Tsois, R.M., Stender, S., Hardt, W.D., Baumler, A.J., Adams, L.G., 2002. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and Immunity* 70, 3843–3855.

ANEXO B

24

25 **Abstract:** *Salmonella enterica* serotype Typhimurium has mechanisms that result in
26 competitive advantage in the inflamed intestine. Here we utilized streptomycin pretreated mice,
27 dextran sodium sulfate (DSS) treated mice, and bovine ligated ileal loops to investigate
28 pathways for *S. Typhimurium* iron acquisition in the inflamed intestine. Coinfection with *S.*
29 Typhimurium reference strain and mutant strains including *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* or *iroN* in
30 streptomycin pretreated mice demonstrated that ferric iron uptake requiring IroN and TonB
31 confers competitive advantage in the inflamed intestine. Importantly, the competitive advantage
32 of *S. Typhimurium* in iron uptake was only observed in inflamed intestinal tissues induced by
33 DSS over the double *tonB feoB* mutant strain.

34

35 **Introduction**

36

37 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) interacts and competes with the
38 intestinal microbiota to acquire nutrients and effectively colonize the intestinal tract. Some of
39 the mechanisms by which *S. Typhimurium* can overgrow the intestinal microbiota have been
40 recently demonstrated (reviewed by Santos, 2014). The *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-
41 1) encodes a type III secretion system (T3SS-1) that is required for invasion of epithelial cells
42 and induction of the host inflammatory response (Tsolis *et al.*, 1999; Barthel *et al.*, 2003; Altier,
43 2005; Bruno *et al.*, 2009; Raffatellu *et al.*, 2009). *Salmonella*-elicited intestinal inflammation
44 generates an environment that favors growth of *S. Typhimurium* while commensal
45 microorganisms are suppressed (Stecher *et al.*, 2007), thus increasing the risk of fecal-oral
46 transmission of this pathogen (Lawley *et al.*, 2008).

47 *S. Typhimurium* requires iron as an essential nutrient. Approximately 7% of the *S.*
48 Typhimurium genome is regulated by levels of iron under *in vitro* conditions (Bjarnason *et al.*,
49 2003). In vertebrates, the ferric (Fe³⁺) and ferrous (Fe²⁺) forms of iron are available
50 extracellularly in limited quantities. One of the mechanisms by which the host limits iron in the
51 inflamed intestine is by secreting lipocalin-2 (Raffatellu *et al.*, 2009), which has bacteriostatic
52 function (Flo *et al.*, 2004), limiting iron availability by specifically binding to enterochelin, a
53 high affinity iron chelator (siderophore) produced by bacteria of the Enterobacteriaceae family
54 (Goetz *et al.*, 2002). Similarly to other enteric bacteria, *S. Typhimurium* secretes enterochelin,
55 but it additionally produces a glycosylated form of enterochelin, an alternative siderophore
56 called salmochelin, which is not blocked by lipocalin-2 and therefore allows *S. enterica* to gain
57 a competitive advantage in the inflamed intestine (Hantke *et al.*, 2003; Crouch *et al.*, 2008;
58 Raffatellu *et al.*, 2009).

59 Iron acquisition through salmochelin is mediated by *iroBCDE* and *iroN*, which are
60 responsible for biosynthesis (*iroB*), export (*iroC*), and absorption (*iroN*) of salmochelin (Hantke

61 *et al.*, 2003; Bäumlér *et al.*, 1996). The process of internalization of this siderophore is an
62 energy dependent process, which requires the TonB/ExbB/ExbD ATP protein-complex located
63 at the inner membrane (Hannavy *et al.*, 1990). Furthermore, TonB generates energy for
64 internalization of ferric-complexes into the periplasm of Gram-negative bacteria by specific
65 outer membrane transporters (reviewed by Braun & Hantke, 2011). The additional intestinal
66 iron source available for *S. Typhimurium* is the ferrous form (Fe²⁺), which *S. Typhimurium*
67 absorbs through a membrane transporter encoded by the *feoABC* operon. FeoB is the inner
68 membrane Fe²⁺ transporter (Tsolis *et al.*, 1996; Boyer *et al.*, 2002).

69 Considering that iron acquisition is a key step in *Salmonella* enteropathogenesis, the
70 aim of this study was to evaluate the role of Fe²⁺ and Fe³⁺ acquisition by *S. Typhimurium* during
71 the intestinal phase of infection, as well as its relation to intestinal inflammation.

72

73 **Material and Methods**

74

75 **Ethics statement**

76 This study was approved by the Committee for Ethical Animals Use (CEUA) of the
77 Universidade Federal de Minas Gerais (Brazil) under protocol numbers 197/2008, 254/2012 and
78 386/2013.

79

80 **Bacterial strains and culture conditions**

81 Bacterial strains are listed in Table 1. IR715 is a nalidixic acid-resistant *S. Typhimurium*
82 strain derived from wild type ATCC14028. The *invA feoB* (SW710), *invA tonB* (SW711), and
83 *invA tonB feoB* mutants (SW712) were constructed by introducing the *invA::pGP704* mutation
84 from SW399 into AJB15 (*feoB* mutant in IR715 strain), AJB36 (*tonB* mutant in IR715 strain),
85 and AJB62 *feoB tonB* mutant in IR715 strain), respectively, by generalized phage transduction
86 (P22 HT *int-105*) (Schmieger, 1972). Confirmation of mutagenesis in *invA feoB* (SW710), *invA*
87 *tonB* (SW711), and *invA tonB feoB* (SW712) was realized by PCR, with primers listed in Table
88 S1. Mutation of *tonB* was confirmed by visualization of a fragment of 2.2 kb corresponding to a
89 fragment of 0.9 kb of the band in the wild type strain plus the 1.3 kb of kanamycin resistance
90 cassette. Mutation of *feoB* was confirmed by visualization of a fragment of 5 kb, which
91 corresponds to the 3 kb fragment of wild type strain plus the 2 kb fragment from tetracycline
92 resistance cassette. Mutation in *invA* was confirmed by visualization of a fragment of 0.5 kb in
93 *invA feoB* (SW710), *invA tonB* (SW711), and *invA tonB feoB* (SW712) mutants, which is
94 consistent with the insertion of *invA::pGP704* (Figura 1).

95 Bacteria were cultured aerobically for 18 hours at 37°C under agitation in Luria-Bertani
96 (LB) broth with appropriate antibiotics, followed by dilution 1:50 in LB broth (without
97 antibiotic) and incubation for 3 hours at 37°C under agitation. Bacterial concentration was

98 estimated by measuring the optical density of cultures at 600 nm (OD600). Antibiotics were
99 added to LB broth cultures and LB agar plates at the following concentrations: 50 mg L⁻¹
100 nalidixic acid, 12.5 mg L⁻¹ tetracycline, 100 mg L⁻¹ kanamycin, and 100 mg L⁻¹ ampicillin.
101 Competitive indices were obtained by dividing the output ratio (CFU of the reference strain
102 over CFU of the mutant) by the input ratio (CFU of the reference strain over CFU of the
103 mutant).

104 For *in vitro* growth, reference strain (AJB715) and mutant strains of *S. Typhimurium*
105 were cultured overnight at 37°C under agitation in Nutrient Broth (NB) with 0.2 mM
106 2,2'-dipyridil (Sigma Aldrich). Microbiological growth was estimated by measuring OD600.
107 Cultures were inoculated with an initial 0.01 OD600 in NB, NB supplemented with 40 μM
108 FeSO₄, 40 μM FeCl₃ or 0.2 mM dipyridyl, and OD600 was measured after 24 hours.

109

110 **Streptomycin-pretreated mouse model**

111 Six to eight-week-old female C57BL/6 mice were pretreated with streptomycin as
112 previously described (Barthel *et al.*, 2003) and intragastrically inoculated with 0.1 mL of a 1:1
113 mixture containing 1×10⁷ CFU of *S. Typhimurium* IR715 *phoN* mutant (AJB715), hereafter
114 named reference strain, and either one of the following mutant strains: *tonB feoB* (AJB62), or
115 *feoB* (AJB15), or *tonB* (AJB36), or *iroN* (AJB52). In parallel, mice were infected under the
116 same conditions with a *phoN invA S. Typhimurium* mutant strain (TH199) and either one of the
117 following mutant strains: *invA tonB feoB* (SW712), or *invA feoB* (SW710), or *invA tonB*
118 (SW711), or *invA iroN* (SPN454). Samples were collected at 48 hours post infection (hpi) for
119 bacteriologic culture, histopathology, and quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR). Fecal
120 pellets were homogenized in 2 mL of sterile PBS and plated on LB agar containing nalidixic
121 acid and on LB agar containing nalidixic acid and other appropriate antibiotics to the respective
122 mutant strain. Cecum was collected for histopathological and qRT-PCR analysis. Total RNA
123 was extracted from cecum using the Tri-reagent (Molecular Research Center) and processed as
124 described (Raffatellu *et al.*, 2008). qRT-PCR was performed using SYBR Green (Applied
125 Biosystems), 7900HT Fast Real-Time PCR System and data were analyzed using the
126 comparative delta-Ct method (Livak & Schmittgen, 2001) normalized by transcriptional level of
127 gene *gapdh*. Primers used for qRT-PCR are listed in Table S2.

128

129 **Dextran sulfate sodium (DSS) mouse model of enteritis**

130 Six to eight-week-old female C57BL/6 mice received oral administration of DSS 3%
131 diluted in sterile water *ad libitum*. After 120 hours of DSS administration, mice were submitted
132 to 4 hours of food and water withdrawal, and then inoculated with 0.1 mL of a 1:1 mixture
133 containing 1×10⁷ CFU of *S. Typhimurium phoN* mutant (AJB715), and one of the following
134 mutant strains: *tonB feoB* (AJB62), or *feoB* (AJB15), or *tonB* (AJB36), or *iroN* (AJB52). DSS

135 treatment was maintained until euthanasia. Cecum and colon were collected at 48 hpi for
136 bacteriologic culture and histopathology.

137

138 **Bovine ligated ileal loop model**

139 Four healthy 4-week-old male *Salmonella*-free Holstein calves were used. Ligated ileal
140 loops were surgically made as previously described (Santos *et al.*, 2002). Loops were inoculated
141 with intraluminal injection of 3 mL of sterile LB broth or with 3 mL of a 1:1 mixture containing
142 1×10^9 CFU of the reference strain *phoN* (AJB715), and one of the following mutant strains:
143 *tonB feoB* (AJB62), or *feoB* (AJB15), or *tonB* (AJB36), or *iroN* (AJB52). In parallel, loops were
144 inoculated under the same conditions with a *phoN invA* mutant (TH199), and one of the
145 following mutant strains: *invA tonB feoB* (SW712), or *invA feoB* (SW710), or *invA tonB*
146 (SW711), or *invA iroN* (SPN454). Samples were collected at 8 hpi for bacteriology and
147 histopathology. Intestinal fluid and homogenates from fragments of the intestinal mucosa
148 obtained with 6 mm biopsy punches in 2 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) were
149 plated on LB agar plates containing nalidixic acid and appropriate antibiotics.

150

151 **Statistical analysis**

152 Bacteriology and mRNA levels measured by qRT-PCR were logarithmically
153 transformed and analyzed by ANOVA followed t test. Histopathology scores were analyzed by
154 Mann Whitney test.

155

156 **Results and discussion**

157

158 The reference strain (AJB715) as well as the *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* and *iroN* mutant strains were
159 phenotypically evaluated under different conditions of iron availability *in vitro*. This
160 experimental design included a mutant strain defective for of the salmochelin receptor (*iroN*
161 mutant), a mutant strain defective for Fe^{3+} uptake (*tonB* mutant), a mutant strain lacking the Fe^{2+}
162 uptake system (*feoB* mutant), and a mutant strain incapable of uptaking both Fe^{2+} and Fe^{3+} (*tonB*
163 *feoB* mutant). The reference strain had similar growth rate in NB or when cultured in NB
164 supplemented with 40 μM FeSO_4 or supplemented with 40 μM FeCl_3 (Figure 2), which was
165 also observed in the case of *feoB*, *tonB*, and *iroN* mutant strains. Only the double mutant strain
166 (*feoB* and *tonB*) resulted in impairment of growth in NB media compared to growth in NB
167 supplemented with FeSO_4 or FeCl_3 . Conversely, all strains tended to have an impaired growth in
168 iron-depleted media (NB containing dipyrindyl, a ferrous iron chelator). However this effect was
169 more marked in *tonB* and *tonB feoB* mutant strains. These results demonstrate that deprivation
170 of iron (Fe^{2+} or Fe^{3+}) is detrimental to *Salmonella* Typhimurium growth *in vitro*, with more

171 marked effect in the absence of ferric iron acquisition system (i.e. *tonB* and *tonB feoB* mutants)
172 when compared to the absence of a ferrous iron acquisition system (*feoB* mutant).

173 To determine how intestinal inflammation affects the uptake of Fe^{2+} and Fe^{3+} by *S.*
174 *Typhimurium*, we utilized the streptomycin-pretreated mouse model. Streptomycin-pretreated
175 mice develop acute neutrophilic typhlitis after infection with *S. Typhimurium*, and this
176 inflammatory response is dependent on the invasion-associated T3SS-1 (Barthel *et al.*, 2003).
177 Therefore, to evaluate the role of Fe^{2+} and Fe^{3+} uptake mechanisms in intestinal colonization of
178 *S. Typhimurium*, we determined the ability of *iroN*, *tonB*, *feoB*, and *tonB feoB* mutant strains to
179 compete with their respective wild type strain in streptomycin-pretreated mice. To investigate
180 the effect of inflammation on iron uptake by *S. Typhimurium*, these experiments were
181 performed both in a wild type background, and in an *invA* mutant background, which lacks a
182 functional T3SS-1 (Raffatellu *et al.*, 2009). As expected (Barthel *et al.*, 2003), streptomycin
183 pretreated mice coinfecting with *S. Typhimurium* reference strain and *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* or
184 *iroN* mutants developed cecal inflammation at 48 hpi, while coinfection with the invasion-
185 defective *S. Typhimurium invA* mutant and the *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* or *invA*
186 *iroN* mutants elicited less inflammation at the same time point, as demonstrated by
187 histopathology and *cxcl-1* and *cxcl-2* transcription analysis (Fig. 3). Additionally, *lcn-2*
188 (lipocalin-2) transcription was also reduced in a less inflamed intestinal environment (i.e. mice
189 infected with *invA* mutant *S. Typhimurium* strains).

190 Approximately 10^8 CFU of the *S. Typhimurium* reference strain were recovered from
191 fecal pellets of mice from all groups, which was similar to *invA* mutant strains from all groups
192 (data not shown). In the wild-type strain background, competitive colonization defects were
193 observed for *tonB feoB* (361-fold), *feoB* (33-fold), *tonB* (3-fold) or *iroN* (4-fold) mutant strains,
194 with the *tonB feoB* mutant exhibiting the most marked defect (Fig. 3E). The competitive defects
195 for the *tonB feoB*, *tonB* or *iroN* mutants, all defective for Fe^{3+} uptake mechanisms, were reduced
196 (*tonB feoB*) or absent (*tonB*, *iroN*) when the same experiment was conducted on an *invA* mutant
197 background, in which reduced inflammation was observed (Fig. 3E). In contrast, the
198 competitive defect of the *feoB* mutant was the same in both wild type and *invA* backgrounds,
199 indicating that it was independent of inflammation, and that Fe^{2+} uptake is equally required
200 under both inflammatory and non-inflammatory conditions in the intestine. Since both TonB
201 and IroN are required for uptake of salmochelin, our results showing a requirement for TonB
202 and IroN uptake during inflammation are in good agreement with a previous study (Raffatellu *et*
203 *al.*, 2009). Our results are also consistent with a previous study that demonstrated a modest
204 effect of a *tonB* mutation in mice infected intragastrically (IG) in the absence of streptomycin
205 (Tsolis *et al.*, 1996), as well as a contribution of FeoB to fitness of *S. Typhimurium* in the non-
206 inflamed intestine. In the setting of inflammation, TonB-dependent iron uptake was also

207 required for the probiotic activity of *E. coli* Nissle1917 (Deriu *et al.*, 2013), suggesting that Fe³⁺
208 is limiting to both *E. coli* and *Salmonella* in the inflamed intestine.

209 Streptomycin induces marked changes in the composition of the intestinal microbiota
210 (dysbiosis), with a decrease in the diversity of microbial communities in the cecum and ileum of
211 mice infected with *S. Typhimurium* (Garner *et al.*, 2009). Furthermore, streptomycin treated
212 mice develop mild cecal inflammation even in the absence of *S. Typhimurium* infection (Spees
213 *et al.*, 2013). In order to determine the general influence of inflammation on iron uptake
214 mechanisms in the intestine, competitive infections of *S. Typhimurium* and the mutant strains
215 included in this study were performed in mice with chemically induced (by 3% DSS) acute
216 intestinal inflammation. DSS treatment induces acute and chronic colitis in mice. The acute
217 phase is characterized by a neutrophilic ulcerative colitis, body weight loss, and diarrhea
218 (Okayasu *et al.*, 1990). Therefore, DSS treated mice developed inflammatory changes in the
219 cecum (Fig. 4A) and colon (Fig. 4B), evidenced by moderate neutrophilic and lympho-histio-
220 plasmacytic infiltration in the mucosa and submucosa, and moderate submucosal edema, and
221 were coinfecting with *S. Typhimurium* reference strain and *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* or *iroN*
222 mutants.

223 Competitive indices between the reference and mutant strains in intestinal tissues
224 obtained at 48 hpi from 3% DSS treated mice demonstrated that the reference strain (AJB715)
225 had 15- and 12-fold higher CFU numbers when compared to the *tonB* mutant in the cecum and
226 colon, respectively (Fig. 4C and 4D). Similar results were obtained with the *tonB feoB* mutant
227 (Fig. 4C and 4D). This overgrowth was also induced upon iron uptake via *IroN*, as the reference
228 strain was recovered in 5- and 6-fold higher CFU numbers than *iroN* mutant in the cecum (Fig.
229 4C) and colon (Fig. 2D), respectively. The *S. Typhimurium* reference strain was recovered in
230 equal amounts when compared to the *feoB* mutant strain in the cecum (Fig. 4C), and only 3-fold
231 higher CFU numbers than *feoB* mutant in the colon tissues (Fig. 4D). These results indicated
232 that intestinal inflammation in DSS colitis model has similar influence in defective growth of
233 mutant with loss of ferric iron acquisition system.

234 The competitive advantage of *Salmonella* with intact iron acquisition pathways was also
235 evaluated in cattle, a host species that naturally responds to *S. Typhimurium* with acute
236 intestinal inflammation (Costa *et al.*, 2012), paralleling the clinical and pathological
237 manifestations of *S. Typhimurium* infection in human patients. The T3SS-1 effector proteins
238 encoded in SPI-1 were demonstrated to mediate influx of neutrophils and fluid accumulation in
239 the bovine ligated ileal loop model (Santos *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2012).
240 In the present study, fluid contents and bovine ileal tissues were collected at 8 hpi from loops
241 inoculated with a 1:1 mixture of the reference strain and one of the mutant strains, similarly to
242 mouse experiments described above. *S. Typhimurium* reference strain and the mutant strains
243 were recovered in similar CFU numbers from intestinal fluid and the ileal mucosa (Fig. 5).

244 There were also similar CFU numbers of *S. Typhimurium invA* and the *invA tonB feoB*, *invA*
245 *feoB*, *invA tonB* or *invA iroN* mutants in the intestinal fluid and ileal mucosa (Fig. 5).
246 Importantly, coinfection of the reference strain and *tonB feoB*, *feoB*, *tonB* or *iroN* mutants
247 elicited a prominent inflammatory response at 8 hpi in the bovine ileal mucosa (not shown).
248 These results are in agreement with previous report in which *S. Typhimurium* induced marked
249 inflammatory changes at 5 hpi (Santos *et al.*, 2002). As expected, coinfection with *S.*
250 *Typhimurium* mutant defective in invasion *invA* and the *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB*
251 or *invA iroN* mutants caused markedly less pathology when compared to the *S. Typhimurium*
252 reference strain (not shown). This was the first attempt to use bovine ileal ligated loop model to
253 elucidate iron uptake of *S. Typhimurium*, but this experimental model has an intrinsic
254 limitation, which is that the experiment can be conducted only for a few hours since the calf
255 remains under anesthesia during the course of the experiment (Alves *et al.*, 2003). The number
256 of doublings that can be accomplished during 8 hours of infection in bovine ileal ligated loops is
257 limited, which may explain why this assay did not reveal any competitive advantage to strains
258 that carry intact iron uptake pathways in comparison to mutants.

259 In summary, ferric iron uptake mediated by salmochelin and by a TonB energy carrier
260 of *S. Typhimurium* provided a fitness advantage in the inflamed intestine of streptomycin
261 pretreated mice. Ferrous iron uptake mediated by FeoB also provided benefit during intestinal
262 colonization by *S. Typhimurium* in streptomycin pretreated mice, but this advantage was not
263 dependent on an inflamed intestinal environment.

264

265 **Acknowledgements**

266

267 Work in RLS lab is supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento
268 Científico e Tecnológico, Brazil), and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
269 de Minas Gerais, Brazil). This study was supported by a PNPd fellowship for JPSM from
270 CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and a fellowship
271 from the John Simon Guggenheim Memorial Foundation to RLS.

272

273 **References**

274

- 275 Altier C (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43**: 85–
276 92.
- 277 Alves GES, Hartsfield SM, Carroll GL, Santos DAML, Zhang S, Tsolis RM, Bäumlér AJ,
278 Adams LG & Santos RL (2003) Emprego do propofol, isofluorano e morfina para a
279 anestesia geral de longa duração em bezerros. *Arq Bras Med Vet Zootec* **55**: 411–420.
- 280 Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K,

281 Rüssmann H & Hardt WD (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a
282 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both
283 pathogen and host. *Infect Immun* **71**: 2839–2858.

284 Bäumler AJ, Norris TL, Lasco T, Voight W, Reissbrodt R, Rabsch W & Heffron F (1998) IronN,
285 a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J*
286 *Bacteriol* **180**: 1446–1453.

287 Bäumler AJ, Tsolis RM, van der Velden AW, Stojiljkovic I, Anic S & Heffron F (1996)
288 Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene* **183**: 207–213.

289 Bjarnason J, Southward CM & Surette MG (2003) Genomic profiling of iron-responsive gene in
290 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium high-throughput screening of a random
291 promoter library. *J Bacteriol* **185**: 4973–4982.

292 Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P & Cellier MF (2002) Acquisition of Mn (II) in addition to
293 Fe (II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect*
294 *Immun* **70**: 6032–6042.

295 Braun V & Hantke K (2011) Recent insights into iron import by bacteria. *Curr Opin Chem Biol*
296 **15**: 328–334.

297 Bruno VM, Hannemann S, Lara-Tejero M, Flavell RA, Kleinstein SH & Galán JE (2009)
298 *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in
299 cultured epithelial cells. *Plos Pathog* **5**: e1000538

300 Costa LF, Paixão TA, Tsolis RM, Bäumler AJ & Santos RL (2012) Salmonellosis in cattle:
301 advantages of being an experimental model. *Res Vet Sci* **93**: 1–6.

302 Crouch ML, Castor M, Karlinsey JE, Kalthorn T & Fang FC (2008) Biosynthesis and IroC-
303 dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella*
304 *enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **67**: 971–983.

305 Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, Edwards RA, Ochoa RJ, Contreras H, Libby SJ, Fang FC &
306 Raffatellu M (2013) Probiotic bacteria reduce *Salmonella* Typhimurium intestinal
307 colonization by competing for iron. *Cell Host Microbe* **14**: 26–37.

308 Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S & Aderem A
309 (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by
310 sequestering iron. *Nature* **432**: 917–921.

311 Frawley ER & Fang FC (2014) The ins and outs of bacterial iron metabolism. *Mol Microbiol*
312 **93**: 609–616.

313 Garner CD, Antonopoulos DA, Wagner B, Duhamel GE, Keresztes I, Ross DA, Young VB &
314 Altier C (2009) Perturbation of the small intestine microbial ecology by streptomycin
315 alters pathology in a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium murine model of infection.
316 *Infect Immun* **77**: 2691–2702.

317 Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN & Strong RK (2002) The

318 neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophores
319 mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**: 1033–1043.

320 Hannavy K, Barr GC, Dorman CJ, Adamson J, Mazengera LR, Gallagher MP, Evans JS, Levine
321 BA, Trayer IP & Higgins CF (1990) TonB Protein of *Salmonella* Typhimurium. A model
322 for signal transduction between membranes. *J Mol Biol* **216**: 897–910.

323 Hantke K, Nicholson G, Rabsch W & Winkelmann G (2003) Salmochelins, siderophore of
324 *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the
325 outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 3677–3682.

326 Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MR, Winter S Papaconstantinopoulou A,
327 Dougan G & Bäumler AJ (2003) Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of
328 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and
329 persistence determinants. *Infect Immun* **71**: 629–640.

330 Lawley TD, Bouley DM, Hoy YE, Gerke C, Relman DA & Monack DM (2008) Host
331 transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence
332 factors and indigenous intestinal microbiota. *Infect Immun* **76**: 403–416.

333 Livak J & Schmittgen D (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time
334 quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} method. *Methods* **25**: 402–408.

335 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y & Nakaya R (1990) A novel
336 method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in
337 mice. *Gastroenterology* **98**: 694–702.

338 Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio SP, Paixao TA, Butler BP, Chu H,
339 Santos RL, Berger T, Mak TW, Tsolis RM, Bevins CL, Solnick JV, Dandekar S &
340 Bäumler AJ. (2009) Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica*
341 serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host*
342 *Microbe* **5**: 476–486.

343 Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven D, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I,
344 Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S & Bäumler AJ. (2008) Simian
345 immunodeficiency virus-induced mucosal IL-17 deficiency promotes *Salmonella*
346 dissemination from the gut. *Nat Med* **14**: 421–428.

347 Paixão TA, Roux CM, den Hartigh AB, Sankaran-Walters S, Dandekar S, Santos RL & Tsolis
348 RM (2009) Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive
349 tract requires urease, the typeIV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect*
350 *Immun* **77**: 4197–4208.

351 Santos RL (2014) Pathobiology of *Salmonella*, intestinal microbiota, and the host innate
352 immune response. *Front Immunol* **5**: 252–2014.

353 Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Bäumler AJ & Adams LG (2002) Morphologic and molecular
354 characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Vet Pathol* **39**:

355 200–215.

356 Schmieger H (1972) Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol*
357 *Gen Genet* **119**: 75–88.

358 Spees AM, Wangdi T, Lopez CA, Kingsbury DD, Xavier MN, Winter SE, Tsois RM &
359 Bäumler AJ (2013) Streptomycin-induced inflammation enhances *Escherichia coli* gut
360 colonization through nitrate respiration. *Mbio* **4**: e00430-13.

361 Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S,
362 Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, von Mering C & Hardt WD. (2007)
363 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the
364 intestinal microbiota. *Plos Biol* **5**: 2177–2189.

365 Stojiljkovic I, Bäumler AJ & Heffron F (1995) Ethanolamine utilization in *Salmonella*
366 *typhimurium*: nucleotide sequence, protein expression, and mutational analysis of the
367 *cchAcchBeutEeutJeutGeutH* gene cluster. *J Bacteriol* **177**: 1357–1366.

368 Tsois RM, Adams LG, Ficht TA & Bäumler AJ (1999) Contribution of *Salmonella typhimurium*
369 virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun* **67**: 4879–4885.

370 Tsois RM, Bäumler AJ, Heffron F & Stojiljkovic I (1996) Contribution of TonB- and Feo-
371 mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* **64**:
372 4549–4556.

373 Winter SE, Thiennimitr P, Nuccio SP, Haneda T, Winter MG, Wilson RP, Russell JM, Henry T,
374 Tran QT, Lawhon SD, Gomez G, Bevins CL, Rüssmann H, Monack DM, Adams LG &
375 Bäumler AJ (2009) Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation
376 during *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection. *Infect Immun* **77**, 1904–1916.

377 Winter SE, Winter MG, Poon V, Keestra AM, Sterzenbach T, Faber F, Costa LF, Cassou F, Costa
378 EA, Alves GE, Paixão TA, Santos RL & Bäumler AJ. (2014) *Salmonella enterica* serovar
379 Typhi conceals the invasion associated type three secretion system from the innate immune
380 system by gene regulation. *Plos Pathog* **10**: e1004207.

381 Zhang S, Santos RL, Tsois RM, Stender S, Hardt WD, Bäumler AJ & Adams LG (2002) The
382 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD,
383 and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* **70**: 3843–3855.

384

385 **Table 1.** *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains used in this study.

Strain	Genotype	Reference
AJB15	IR715 <i>feoB</i> ::Tet ^R	Tsolis <i>et al.</i> , 1996
AJB36	IR715 <i>tonB</i> ::Kan ^R	Tsolis <i>et al.</i> , 1996
AJB52	IR715 <i>iroN</i> ::pGP704-Amp ^R	Bäumler <i>et al.</i> , 1998
AJB62	IR715 <i>feoB</i> ::Tet ^R <i>tonB</i> ::Kan ^R	Tsolis <i>et al.</i> , 1996
AJB715	IR715 <i>phoN</i> ::Kan ^R	Kingsley <i>et al.</i> , 2003
IR715	ATCC 14028 Nal ^R	Stojiljkovic <i>et al.</i> , 1995
SPN452	IR715 <i>invA</i> :: <i>tetRA</i> <i>spiB</i> ::KSAC-Kan ^R	Raffatellu <i>et al.</i> , 2009
SPN454	IR715 <i>invA</i> :: <i>tetRA</i> <i>spiB</i> ::KSAC-Kan ^R <i>iroN</i> ::pGP704-Amp ^R	Raffatellu <i>et al.</i> , 2009
SW399	IR715 <i>invA</i> ::pGP704	Winter <i>et al.</i> , 2009
SW710	IR715 <i>invA</i> ::pGP704 <i>feoB</i> ::Tet ^R	This study
SW711	IR715 <i>invA</i> ::pGP704 <i>tonB</i> ::Kan ^R	This study
SW712	IR715 <i>invA</i> ::pGP704 <i>feoB</i> ::Tet ^R <i>tonB</i> ::Kan ^R	This study
TH199	IR715 <i>phoN</i> ::Kan ^R <i>invA</i> :: <i>tetra</i>	Winter <i>et al.</i> , 2014

386 ^aTet^R: Tetracycline resistance (*tetRA*); Kan^R: Kanamycin resistance; Amp^R: Ampicillin
387 resistance; Nal^R: Nalidixic acid resistance.

388 **Figure Legends**

389

390 **Fig. 1.** Confirmation of *S. Typhimurium* mutants by PCR. (A) Schematic representation of the
391 target genes and mutagenesis approach. The *tonB* and *feoB* coding sequence was interrupted by
392 inserting a kanamycin (Kan^R) or tetracycline (Tet^R) resistance gene cassette. The *invA* gene was
393 disrupted by insertion of a derivative of pGP704. Approximate location of primer binding sites
394 is indicated by half-headed arrows. (B) The indicated *S. Typhimurium* strains served as
395 templates for the amplification of the various gene targets. PCR products were separated by
396 agarose gel electrophoresis. Approximate size markers are indicated on the left side of the panel.

397 **Fig. 2.** Growth of *S. Typhimurium* reference strain and iron defectives mutants in iron-
398 supplemented and iron-depleted media. Reference strain of *S. typhimurium* (ABJ715) and *tonB*
399 *feoB*, *feoB*, *tonB* and *iroN* mutants were inoculated in an initial optical density at 600 nm
400 (OD600) of 0.01 in NB, NB supplemented with 40 μ M FeSO₄ (+FeSO₄), FeCl₃ 40 μ M
401 (+FeCl₃) or 0.2 mM dipyriddy (-Fe dipyriddy) and OD600nm measurement was performed after
402 24 hours. Bars represent means \pm SD of three independent experiments. Asterisk indicates
403 statistical difference in treatments compared to NB media in the same strain, Tukey test, * $P <$
404 0.001. Number sign indicates statistical difference between mutant strains compared to
405 reference strain in the same treatment, Tukey test, # $P <$ 0.001

406

407 **Fig. 3.** Intestinal colonization of C57BL/6 mice pre-treated with streptomycin and coinfectd
408 with *S. Typhimurium* and defective iron acquisition mutant strains. Mice were inoculated with
409 1:1 mixture of 1×10^7 CFU of the *S. Typhimurium* reference strain and one of the mutant strains
410 *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, or *iroN*, or coinfectd in *invA* negative background, with *invA* mutant
411 and one of the mutant strains: *invA tonB feoB*, *invA feoB*, *invA tonB* or *invA iroN*. Histological
412 score of the cecum at 48 hpi (A). Bars represent the average of histopathological scores for
413 submucosal inflammation (SI), mucosal inflammation (MI), and submucosal edema (SE).
414 Transcription levels of *cxcl-2* (B), *cxcl-1* (C) and *lipocalin-2* (D) measured by qRT-PCR in
415 cecum collected at 48 hpi. Bars represent fold change over mock inoculated tissues normalized
416 by transcriptional level of *gadph*. Competitive index of reference strain and iron defective
417 mutants or *invA* mutant and *invA* iron defective mutants in pellet fecal at 48 hpi (E). Bars
418 represent geometric means \pm SEM. * $P <$ 0.05; ** $P <$ 0.01.

419

420 **Fig.4.** Intestinal colonization of C57BL/6 mice treated with DSS 3% and intragastrically
421 coinfectd with *S. Typhimurium* and defective iron acquisition mutant strains Mice received
422 DSS 3% diluted in water for 120 hours and were inoculated with 1:1 mixture of 1×10^7 CFU of
423 the *S. Typhimurium* reference strain (AJB715) and mutants *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, or *iroN*.

424 Histological score of the cecum (A) and colon (B) at 48 hpi. Bars represent the average of
425 histopathological scores for submucosal inflammation (SI), mucosal inflammation (MI), and
426 submucosal edema (SE). Colony-forming units (CFU) recovered in cecum (C) and colon (D) at
427 48 hpi. Columns represent mean and standard error obtained from five mice for group. * $P <$
428 0.05; ** $P < 0.01$.

429

430 **Fig. 5.** Intestinal colonization of bovine ligated ileal coinfecting with *S. Typhimurium* and
431 defective iron acquisition mutant strains. Loops were inoculated with 1:1 mixture of 1×10^9
432 CFU of the *S. Typhimurium* reference strain (AJB715) and *tonB feoB*, *feoB*, *tonB*, or *iroN*
433 mutants. Competitive indices in fluid (A) and ileal fragments (B) at 8 hpi. Columns represent
434 geometric mean and standard error obtained from four calves used for the ligated ileal model.

435

436 **Tabela S1.** Primers used in PCR to confirm mutagenesis in *invA tonB feoB*, *invA feoB*, and *invA*
 437 *tonB* of *Salmonella* Typhimurium.
 438

Primer	Template	Sequence (5'-3')	Target product (kb)
invA Fw invA Rev	SW399	142 ATTACCACGCTCTTTCGTCTG 50 GCATTTATCAGGGTTATTGTCTC	wt ^a : neg. ^b mut ^c : 0.6
feoB Fw feoB Rev	SW710 SW712	740 TACATCCAGTTAGTAAGAAACAAGTAG 741 GGTAACGCTTTCATCTTTGTGG	wt: 3 mut: 5
tonB Fw tonB Rev	SW711 SW712	738 CGCTGTTTATTTATGTTGCCGTCG 739 CCAATGCCTTATTGAATATGATTGC	wt: 0.9 mut.: 2.2

439 ^a wt= wild type *Salmonella* Typhimurium

440 ^b neg= Negative PCR

441 ^c mut= mutant.

442

443 **Table S2.** Primers used for qRT-PCR.

444

Genes*	Primer Sequences (5´- 3`)	Reference
<i>cxcl-1</i>	TGCACCCAAACCGAAGTCAT TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC	Paixão et al., 2009
<i>cxcl-2</i>	AGTGAAGTGCCTGTCAATGC AGGCAAACTTTTGACCGCC	Paixão et al., 2009
<i>lcn-2</i>	ACATTTGTTCCAAGCTCCAGGGC CATGGCGAACTGGTTGTAGTCCG	Deriu et al., 2013
<i>gapdh</i>	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	Paixão et al., 2009

445 *Abbreviations:

446 *cxcl-1* =chemokine (C-X-C motif) ligand 1

447 *cxcl-2* =Chemokine (C-X-C motif) ligand 2

448 *lcn-2* = lipocalin-2

449 *gapdh* = Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Figure 1.

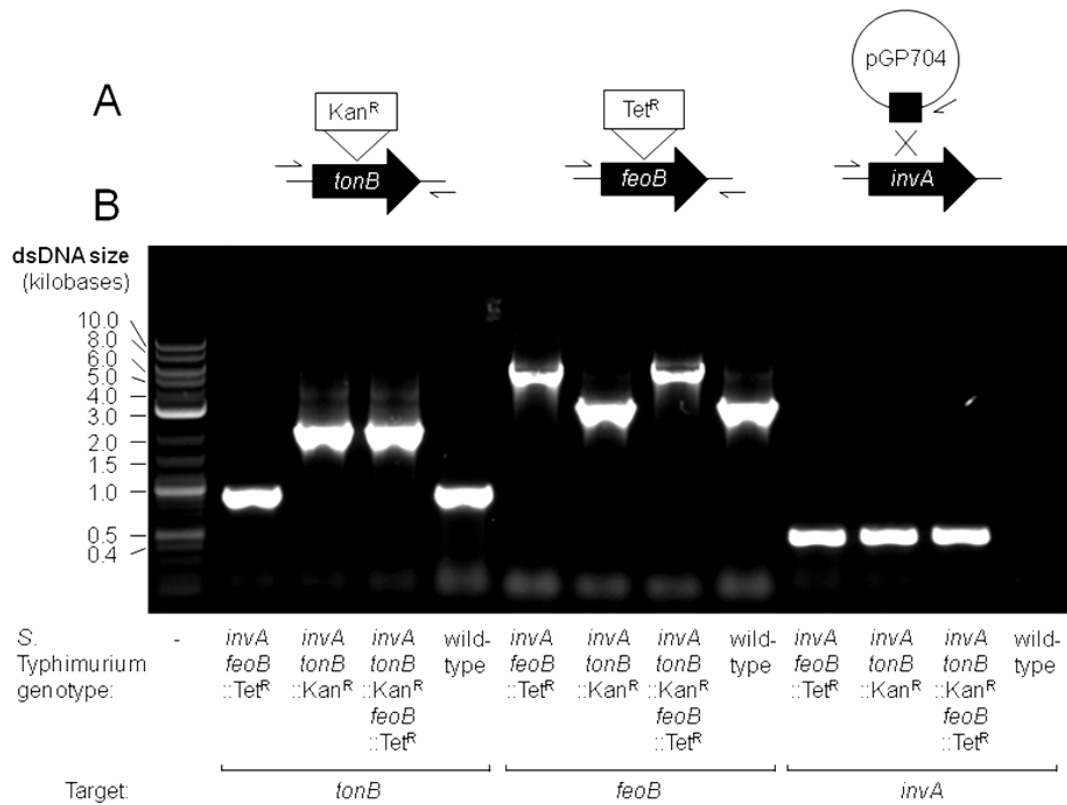


Figure 2.

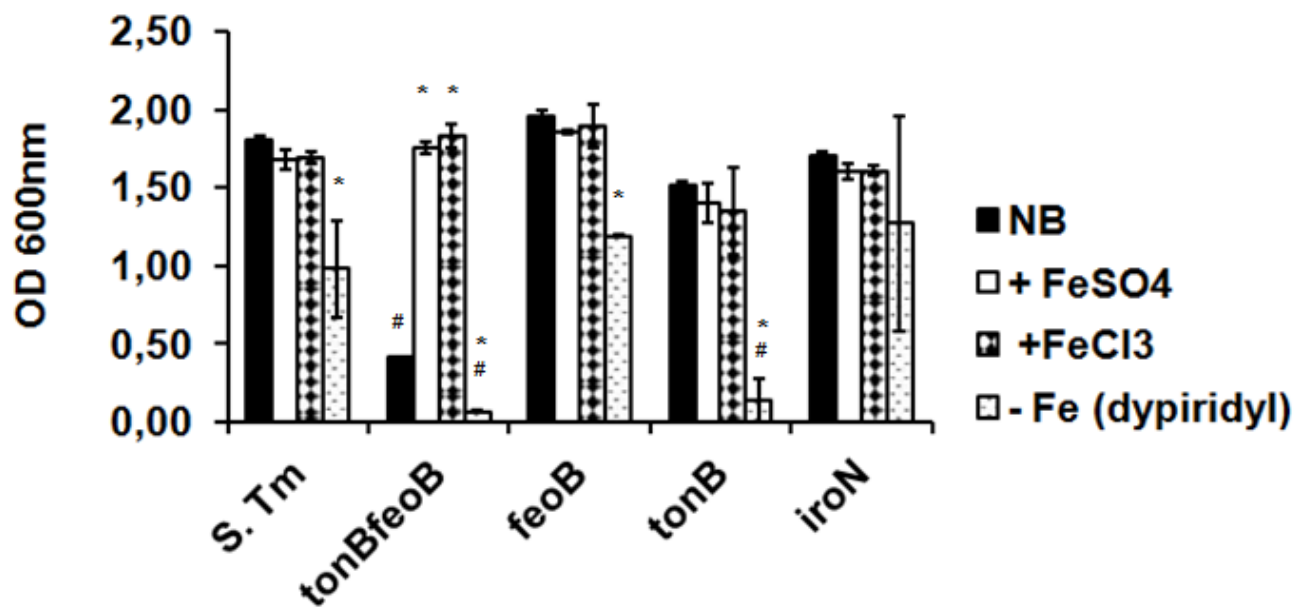


Figure 3.

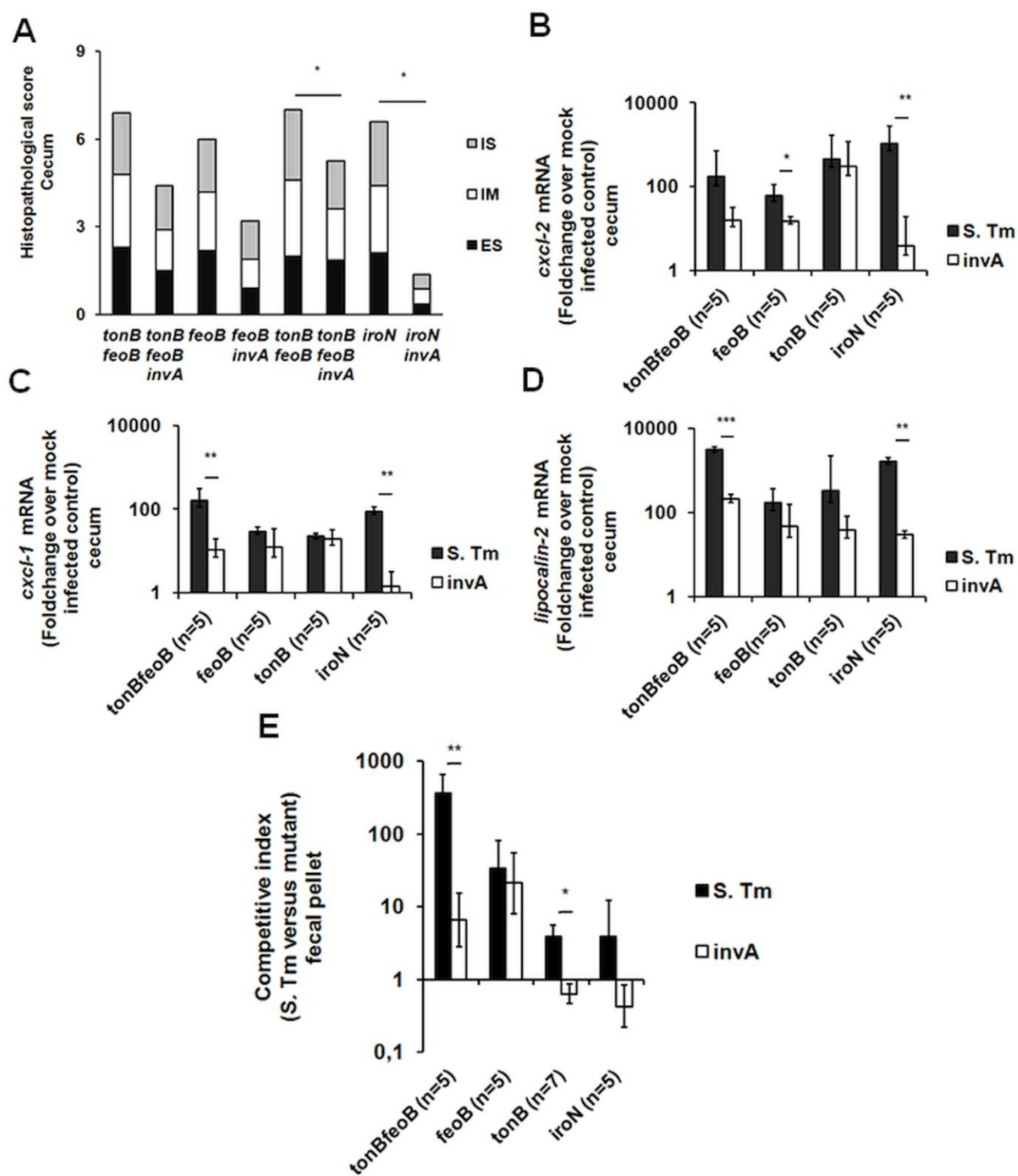


Figure 4.

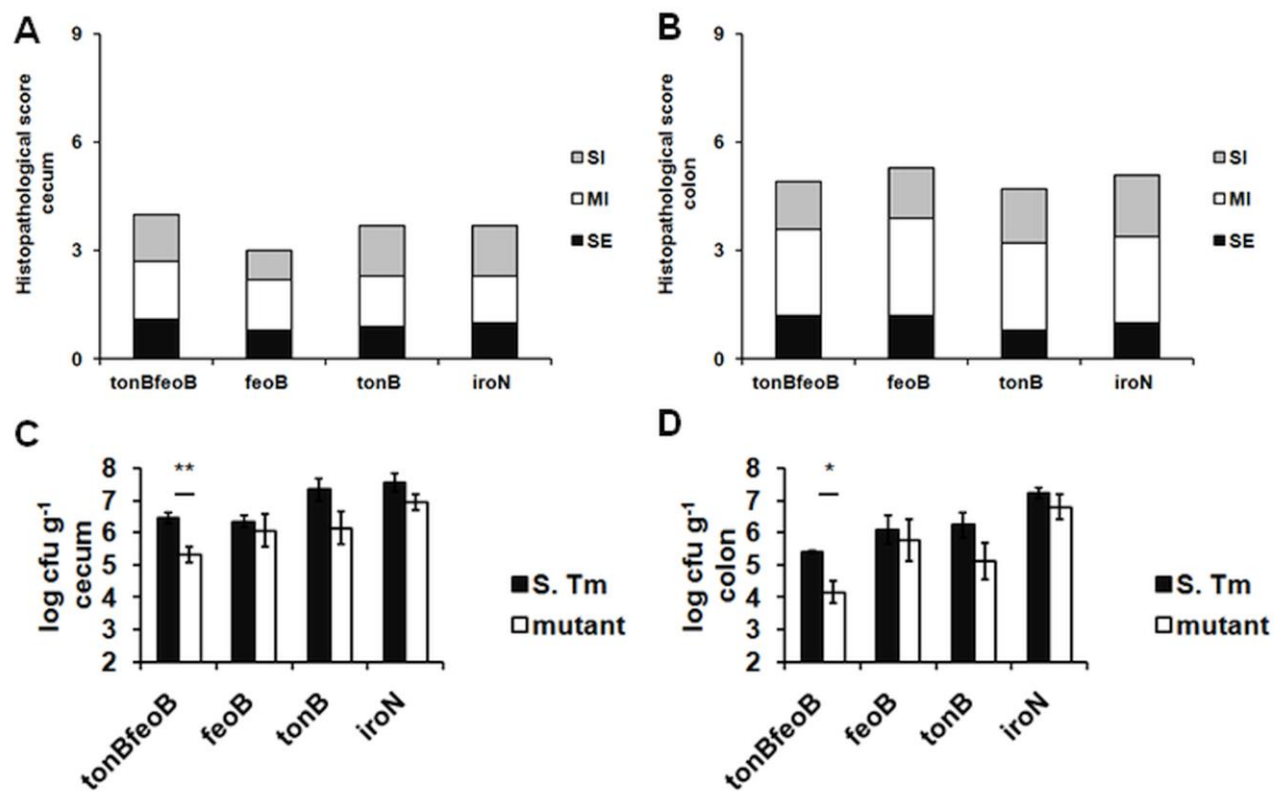
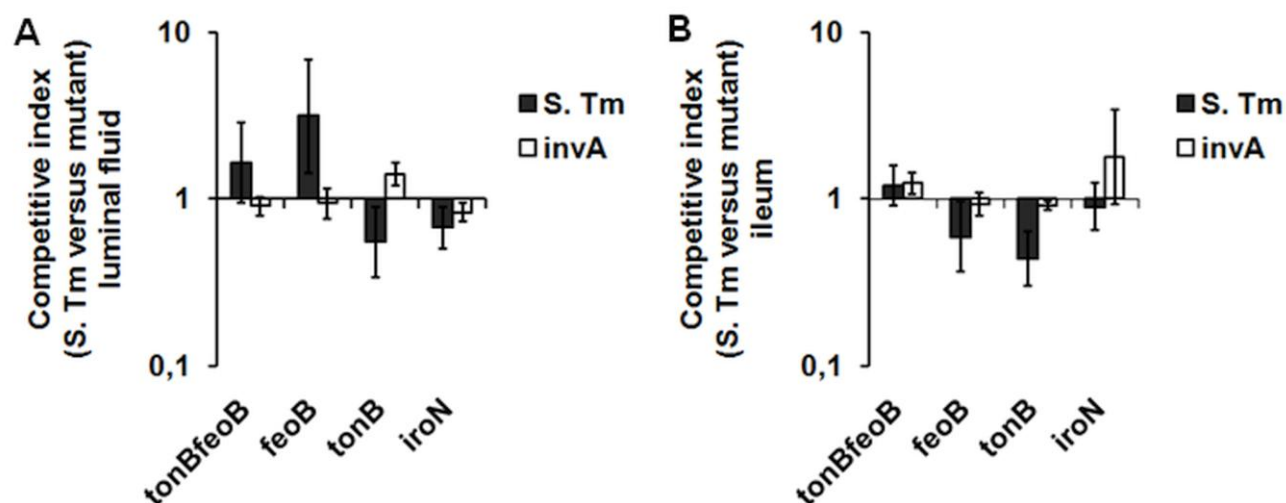


Figure 5.



ANEXO C



Salmonella enterica Serovar Typhi Conceals the Invasion-Associated Type Three Secretion System from the Innate Immune System by Gene Regulation

Sebastian E. Winter^{1‡*}, Maria G. Winter^{1‡}, Victor Poon¹, A. Marijke Kestra¹, Torsten Sterzenbach¹, Franziska Faber¹, Luciana F. Costa², Fabiane Cassou³, Erica A. Costa³, Geraldo E. S. Alves³, Tatiane A. Paixão², Renato L. Santos³, Andreas J. Bäuml¹

1 Department of Medical Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of California, Davis, Davis, California, United States of America, **2** Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Abstract

Delivery of microbial products into the mammalian cell cytosol by bacterial secretion systems is a strong stimulus for triggering pro-inflammatory host responses. Here we show that *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), the causative agent of typhoid fever, tightly regulates expression of the invasion-associated type III secretion system (T3SS-1) and thus fails to activate these innate immune signaling pathways. The *S. Typhi* regulatory protein TviA rapidly repressed T3SS-1 expression, thereby preventing RAC1-dependent, RIP2-dependent activation of NF- κ B in epithelial cells. Heterologous expression of TviA in *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) suppressed T3SS-1-dependent inflammatory responses generated early after infection in animal models of gastroenteritis. These results suggest that *S. Typhi* reduces intestinal inflammation by limiting the induction of pathogen-induced processes through regulation of virulence gene expression.

Citation: Winter SE, Winter MG, Poon V, Kestra AM, Sterzenbach T, et al. (2014) *Salmonella enterica* Serovar Typhi Conceals the Invasion-Associated Type Three Secretion System from the Innate Immune System by Gene Regulation. PLoS Pathog 10(7): e1004207. doi:10.1371/journal.ppat.1004207

Editor: Denise M. Monack, Stanford University School of Medicine, United States of America

Received: December 17, 2013; **Accepted:** May 10, 2014; **Published:** July 3, 2014

Copyright: © 2014 Winter et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This investigation was conducted in a facility constructed with support from Research Facilities Improvement Program Grant Number C06 RR12088-01 from the National Center for Research Resources, National Institutes of Health. This work was supported by American Heart Association Grant 12SDG12220022 to AMK, Public Health Service Grants AI044170 to AJB and AI103248 to SEW as well as a fellowship from the John Simon Guggenheim Memorial Foundation to RLS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: Sebastian.Winter@UTSouthwestern.edu

‡ Current address: Department of Microbiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, United States of America

Introduction

One function of the innate immune system in the intestinal tract is to generate temporary inflammatory responses against invasive enteric pathogens while avoiding detrimental overreaction against harmless commensal bacteria under homeostatic conditions. In contrast to commensal microbes, pathogenic microbes express an array of virulence factors to manipulate host cell functions. Pathogen-induced processes, also known as patterns of pathogenesis [1], activate specific pathways of the innate immune system, enabling the host to distinguish virulent microbes from ones with lower disease-causing potential. By detecting pathogen-induced processes the host can escalate innate immune responses to levels that are appropriate to the threat [2].

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), an invasive enteric pathogen associated with human gastroenteritis, triggers acute intestinal inflammation in the terminal ileum and colon, thereby producing symptoms of diarrhea and abdominal pain within less than one day after ingestion [3]. The inflammatory infiltrate in the affected intestinal tissue is dominated by neutrophils [4,5]. Similarly, neutrophils are the primary cell type in the stool during acute illness [6–8]. In contrast, individuals

infected with serovar Typhi (*S. Typhi*) develop a febrile illness (typhoid fever) with systemic dissemination of the organism. In contrast to *Salmonella*-induced gastroenteritis, only a third of patients develop diarrhea that is characterized by a dominance of mononuclear cells in the stool [6]. The dominant cell type in intestinal infiltrates is mononuclear, while neutrophils are infrequent [9–11]. Unlike *S. Typhi*, interaction of *S. Typhimurium* with intestinal model epithelia induces heparin A3-dependent transmigration of neutrophils [12]. Moreover, infection of human colonic tissue explants with *S. Typhimurium* results in the increased production of the neutrophil-attracting chemokine IL-8, while *S. Typhi* does not elicit this response [13]. These observations suggest that invasion of the intestinal mucosa by *S. Typhimurium* is accompanied by a rapid escalation of host responses leading to acute, purulent inflammation, while *S. Typhi* elicits little intestinal inflammation during early stages of infection, however the molecular mechanisms underlying these apparent differences are poorly defined.

One pathogen-induced processes that triggers pro-inflammatory immune responses is the transfer of bacterial molecules into the host cell cytosol by secretion systems. The invasion-associated type III secretion system (T3SS-1) expressed by all *Salmonella* serovars

Author Summary

Bacterial pathogens translocate effector proteins into the cytoplasm of host cells to manipulate the mammalian host. These processes, e.g. the stimulation of small regulatory GTPases, activate the innate immune system and induce pro-inflammatory responses aimed at clearing invading microbes from the infected tissue. Here we show that strict regulation of virulence gene expression can be used as a strategy to limit the induction of inflammatory responses while retaining the ability to manipulate the host. Upon entry into host tissue, *Salmonella enterica* serovar Typhi, the causative agent of typhoid fever, rapidly represses expression of a virulence factor required for entering tissue to avoid detection by the host innate immune surveillance. This tight control of virulence gene expression enables the pathogen to deploy a virulence factor for epithelial invasion, while preventing the subsequent generation of pro-inflammatory responses in host cells. We conclude that regulation of virulence gene expression contributes to innate immune evasion during typhoid fever by concealing a pattern of pathogenesis.

and delivers effector proteins into the cytosol of epithelial cells [14]. A subset of these translocated effector proteins activate Rho-family GTPases [15–18], thereby triggering alterations in the host cell cytoskeleton that result in bacterial invasion of epithelial cells [19]. Excessive stimulation of Rho-family GTPases activates the transcription factor nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and promotes the subsequent release of proinflammatory cytokines and chemokines [15,20,21]. In a bovine model of *S. Typhimurium*-induced gastroenteritis, the rapid induction of intestinal inflammation and diarrhea requires the T3SS-1 apparatus as well as the effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 [22–24]. Similarly, in a murine model of *Salmonella* induced colitis, SipA, SopE and SopE2 can independently induce intestinal inflammation [25] and mutants lacking a functional T3SS-1 are unable to initiate neutrophil recruitment to the intestinal mucosa during early infection [25,26]. These findings indicate that T3SS-1-mediated effector translocation induces innate immune responses during *S. Typhimurium*-induced colitis.

Similar to *S. Typhimurium*, invasion of cultured intestinal epithelial cells by *S. Typhi* is mediated by the T3SS-1 [27]. Replacement of *S. Typhimurium* T3SS-1 effector proteins with their *S. Typhi* orthologues does not attenuate inflammatory responses elicited by *S. Typhimurium* in the intestinal mucosa of calves [28], demonstrating that *S. Typhi* T3SS-1 effector proteins can exhibit intrinsic pro-inflammatory properties *in vivo*. Thus, the molecular basis for the absence of T3SS-1-dependent innate immune responses early during *S. Typhi* infection remains unclear.

Results

In contrast to *S. Typhimurium*, *S. Typhi* fails to activate the NF- κ B signaling pathway in human epithelial cells

To study the induction of pro-inflammatory signaling pathways upon infection with *S. Typhimurium* and *S. Typhi*, we employed a human epithelial cell line permanently transfected with a NF- κ B-dependent luciferase reporter (HeLa 57A) [29]. Infection with the *S. Typhimurium* wild-type strain SL1344 resulted in a significant increase (7-fold; $P < 0.01$) in luciferase activity compared to mock-infected cells (Fig. 1A), while a derivative of *S. Typhimurium* SL1344 carrying a mutation in the T3SS-1 apparatus gene *invA* (SW767) did not elicit NF- κ B signaling [20,30]. In contrast to the

S. Typhimurium wild type, the *S. Typhi* wild-type strain Ty2 failed to trigger NF- κ B activation (Fig. 1A), suggesting that *S. Typhi* is a poor activator of T3SS-1-dependent inflammatory processes in human epithelial cells.

Effect of the *viaB* operon on T3SS-1 mediated inflammatory responses in epithelial cells

The T3SS-1 mediates invasion of non-phagocytic cells. *S. Typhi* has been reported to differ from *S. Typhimurium* with regards to invasion of human epithelial cells [31–33], thus raising the possibility that the observed differential activation of the NF- κ B signaling pathway could be due to varying degrees of invasiveness. To test this hypothesis, HeLa cells were infected with *S. Typhimurium* and *S. Typhi* strains and a gentamicin protection assay was performed (Fig. 1B). The *S. Typhimurium* wild type SL1344 and the *S. Typhi* wild type Ty2 were recovered in similar numbers, while the respective isogenic *invA*-deficient mutants displayed significantly reduced invasiveness. T3SS-1 activity has two functional consequences: manipulation of host signaling pathways and subsequent bacterial uptake. To discern between effects mediated directly by the T3SS-1 or indirectly by increasing the intracellular bacterial load, we next sought to reinstate invasiveness of the *S. Typhimurium invA* mutant without restoring T3SS-1 function. Expression of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasins, encoded by the plasmid pRI203, raised invasiveness of the *S. Typhimurium invA* mutant comparable to the wild type strain (Fig. 1B), but failed to restore the ability to induce NF- κ B activation in epithelial cells (Fig. 1C) [34]. Taken together, these observations indicate that immune evasion by *S. Typhi* did not directly correlate with the intracellular bacterial load or invasiveness.

Despite causing disparate disease entities, the genomes of *S. Typhimurium* and *S. Typhi* display remarkable similarity. Chromosomal DNA sequences of both serovars are highly syntenic, with mostly minor inversions, deletions and insertions [35,36]. One DNA region that is present in *S. Typhi* but absent from *S. Typhimurium* is the *Salmonella* pathogenicity island 7 (SPI-7). Situated within SPI-7 is the *viaB* locus, an operon encoding regulatory (*tvIA*), biosynthesis (*tvBCDE*), and export (*vexABCDE*) genes involved in the production of the virulence (Vi) capsular polysaccharide of *S. Typhi* [37] (Fig. S1A). The *viaB* locus has been shown to suppress Toll-like receptor (TLR) signaling pathways [13,38,39]. We therefore explored the contribution of the *viaB* locus on diminishing NF- κ B activation in epithelial cells (Fig. 1D and S1B). Deletion of the entire *viaB* locus in *S. Typhi* (Δ *viaB* mutant; SW347) markedly increased the ability to activate NF- κ B in epithelial HeLa cells ($P < 0.001$). Akin to the findings with *S. Typhimurium*, NF- κ B signaling induced by the *S. Typhi viaB* mutant was independent of invasiveness (Fig. S1C) but required a functional T3SS-1 since inactivation of *invA* in the *viaB* mutant background (Δ *viaB invA* mutant, STY4) completely abolished luciferase activity ($P < 0.001$) (Fig. S1D). These results supported the idea that the *viaB* locus attenuates T3SS-1-induced, pro-inflammatory signaling pathways in human epithelial cells.

The *viaB* locus has been shown to alter interaction of *S. Typhi* with host cells through multiple distinct mechanisms (reviewed in [40]). The Vi capsular polysaccharide prevents complement deposition, phagocytosis, and TLR4 activation, while the regulatory protein TviA is known to dampen TLR5 signaling. We therefore wanted to discern whether the absence of NF- κ B signaling in human epithelial cells is due to the production of the Vi capsule or due to altered gene expression mediated by TviA. To this end, the *tvIA* gene cloned into a low copy number plasmid (pTVIA1) was introduced into a *S. Typhi viaB* mutant (STY2). Expression of *tvIA* under control of the native promoter significantly lowered NF- κ B activation ($P < 0.01$) in

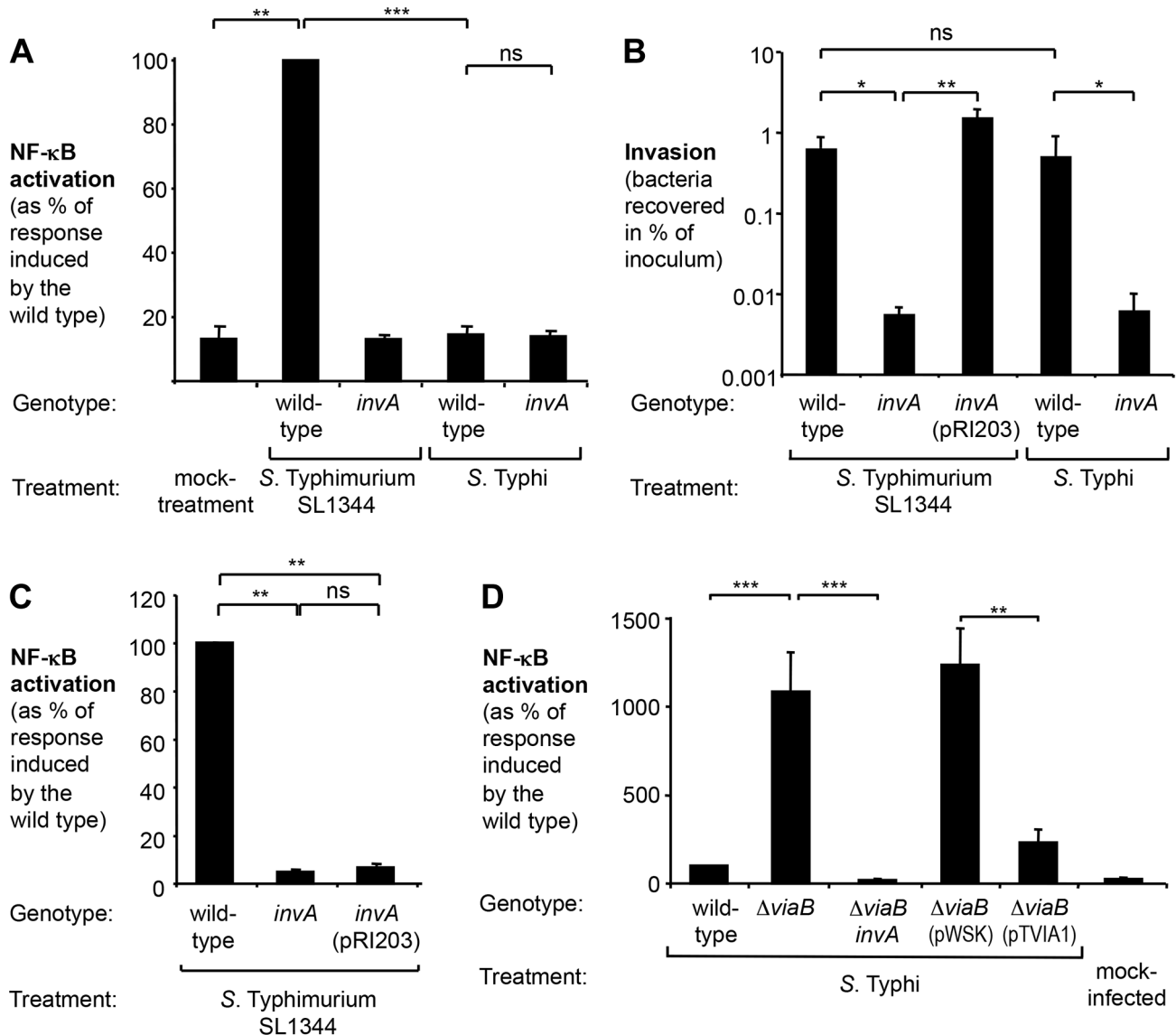


Figure 1. *S. Typhi* does not elicit inflammatory responses in epithelial cells. Human epithelial cells permanently transfected with a NF-κB-luciferase reporter system (HeLa 57A) were infected with the indicated *Salmonella* strains at a multiplicity of infection of 5 or mock treated (bacterial growth media alone). (A) Cells were infected with the *S. Typhimurium* wild type SL1344, an isogenic *invA* mutant (SW767), the *S. Typhi* wild type Ty2, an isogenic *invA* mutant (SW222). Luciferase activity as a measure of NF-κB activation was determined after 5 h (N=3). (B) Monolayers of cells were infected for 1 h with the indicated *Salmonella* strains. Bacterial numbers recovered after 90 min of Gentamicin treatment were standardized to the number of the bacteria in the inoculum (N=4). Plasmid pRI203 encodes the *Y. pseudotuberculosis* invasin. (C) Luciferase activity exhibited by *Salmonella*-infected HeLa57A cells was determined as described above (N=4). (D) Cells were infected the *S. Typhi* wild-type strain Ty2, a $\Delta viaB$ mutant (SW347), an *invA* $\Delta viaB$ mutant (STY4), a $\Delta viaB$ mutant (STY2) harboring the cloning plasmid pWSK29 (pWSK), a $\Delta viaB$ mutant (STY2) expressing the *tviA* gene (pTVIA1) and luciferase activity determined 5 h after infection (N=5). Bars represent geometric means \pm standard error. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not statistically significant. doi:10.1371/journal.ppat.1004207.g001

comparison to cells infected with the *S. Typhi* *viaB* mutant carrying the empty vector control (pWSK29). Remarkably, expression of *tviA* reduced inflammatory responses to levels comparable to the *S. Typhi* wild-type strain (Fig. 1D and S1B), suggesting that the regulatory protein TviA is involved in dampening inflammatory responses in cultured human epithelial cells.

TviA reduces T3SS-1-mediated inflammation in the bovine ligated ileal loop model

We had recently demonstrated that a *S. Typhimurium* strain carrying the *S. Typhi* *viaB* locus on a plasmid elicits less mucosal

inflammation in a bovine ligated ileal loop model than the isogenic *S. Typhimurium* wild type ATCC14028 [38], raising the possibility that TviA might be involved in suppressing inflammatory responses *in vivo*. To delineate the relative contribution of the Vi capsule and the regulator TviA to reducing inflammatory responses in the bovine ligated ileal loop model [23], we repeated these studies with derivatives of *S. Typhimurium* strain ATCC 14028 in which the *phaN* gene in the chromosome had been replaced with the entire *S. Typhi* *viaB* locus (*phaN::viaB* mutant, TH170) or the *tviA* gene only (*phaN::tviA* mutant, SW474). In these strains, transcription of *tviA* and the downstream genes is solely

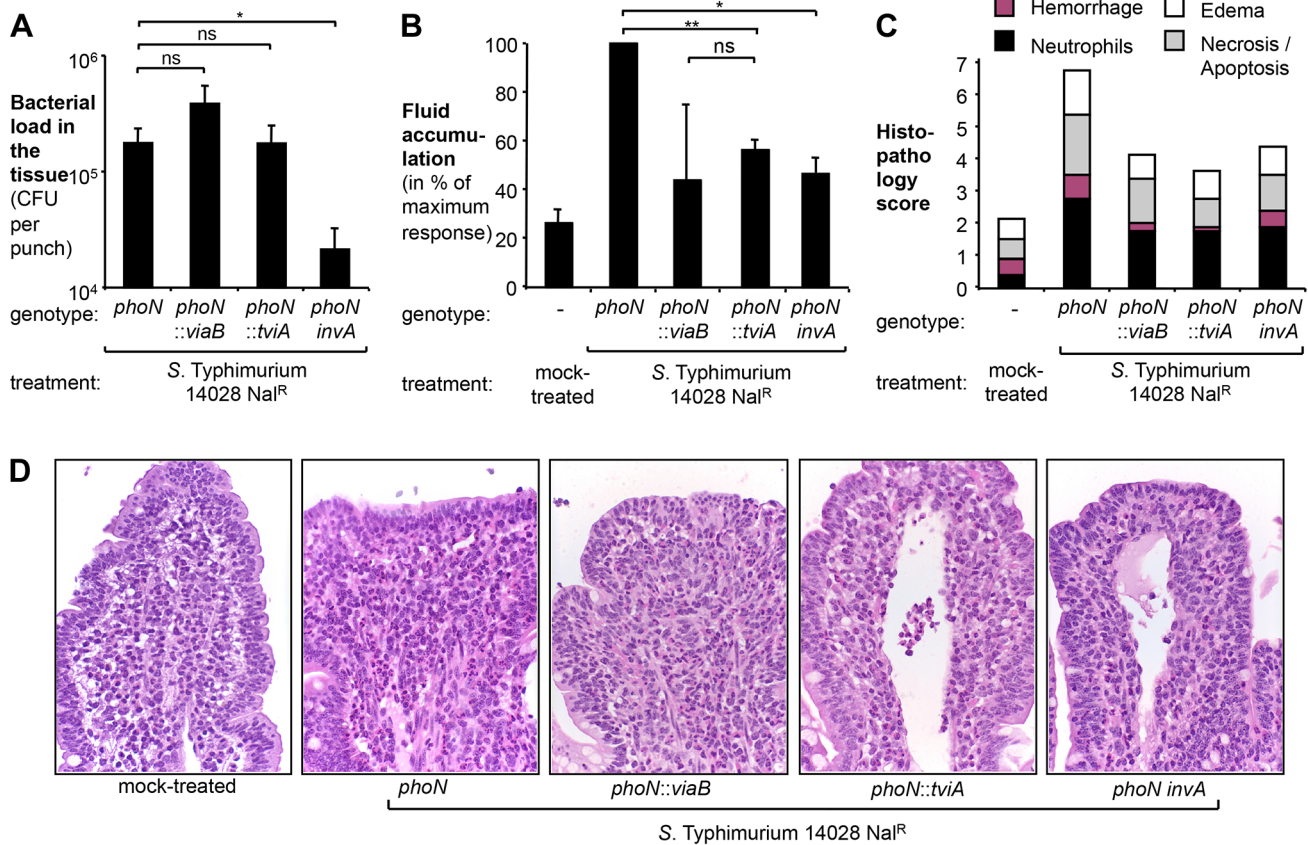


Figure 2. Expression of TviA in *S. Typhimurium* reduces early host responses. Bovine ligated ileal loops (N=4 animals) were mock treated (LB broth) or infected with a *S. Typhimurium* ATCC14028 *phoN* mutant (AJB715), a *phoN::viaB* mutant (TH170), a *phoN::tviA* mutant (SW474), or a *phoN invA* mutant (SW737) pre-cultured in LB broth. Samples were collected 5 h after infection. (A) Bacterial load in the tissue was determined by treating tissue biopsies with Gentamicin and plating on selective media. Bars represent geometric means of bacterial loads \pm standard error. (B) Fluid accumulation recorded 5 h after infection. Data is expressed as a percent of the response observed in loops infected with the *phoN* mutant (maximum response). Bars represent geometric means \pm standard error. (C) Pathological changes in the ileal mucosa. Formalin-fixed ileal tissue was scored by the following criteria: hemorrhage (purple bars), infiltration with neutrophils (black bars), presence of edema (white bars), and necrosis/apoptosis (grey bars). Bars represent the average obtained from 4 animals. (D) Representative images of hematoxylin and eosin-stained sections of the ileal mucosa (magnification 60 \times). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, not statistically significant. doi:10.1371/journal.ppat.1004207.g002

controlled by the native *S. Typhi* promoter [41,42]. This strategy was chosen to ensure that attenuation of intestinal inflammation in this model was not caused by introduction of the *viaB* locus on a multi-copy plasmid [38].

We compared the *phoN::viaB* mutant and the *phoN::tviA* mutant to a strain carrying an antibiotic resistance gene inserted chromosomally in the *phoN* gene (*phoN* mutant, AJB715). The *phoN::viaB* mutant, the *phoN::tviA* mutant, and the isogenic *phoN* mutant were recovered in equal numbers from gentamycin-treated tissue samples five hours after inoculation (Fig. 2A), suggesting that neither the *tviA* gene nor the entire *viaB* locus interfered with tissue invasion. Consistent with our previous observations [38], the *phoN::viaB* mutant elicited less fluid accumulation (Fig. 2B) and less pathological changes in the mucosa (Fig. 2C and D) than the isogenic *phoN* mutant. Remarkably, expression of *tviA* alone (*phoN::tviA* mutant) significantly reduced fluid accumulation and inflammation compared to the *phoN* mutant ($P < 0.01$). The responses elicited by the *phoN::tviA* mutant and the *phoN::viaB* mutant were indistinguishable, suggesting that the *viaB*-mediated attenuation of inflammatory responses five hours after inoculation of bovine ligated ileal loops with *S. Typhimurium* was mostly attributable to the action of the TviA regulatory protein. Taken

together, these data suggested that gene regulation mediated by TviA could dampen inflammatory processes *in vivo*.

TviA represses transcription of regulatory, structural, and effector proteins of the *S. Typhi* T3SS-1

A functional T3SS-1 is required for the induction of intestinal host responses in cattle [22,24,43]. A *S. Typhimurium* strain carrying a mutation in the T3SS-1 apparatus gene *invA* (*invA phoN* mutant, SW737) was significantly less invasive than a *phoN* mutant (Fig. 2A) ($P < 0.05$). Interestingly, inactivation of *invA* (*invA phoN* mutant) reduced fluid accumulation (Fig. 2B) and intestinal inflammation (Fig. 2C and D) by a magnitude that was similar to that observed for the *phoN::tviA* mutant. This finding was consistent with the idea that TviA reduces T3SS-1-dependent host responses *in vivo*, prompting us to further investigate the mechanism by which TviA inhibits T3SS-1 gene expression.

TviA is a key activator of the *tviBCDEeexABCDE* operon but can also control transcription of genes outside its own operon (Fig. S2A). Expression of TviA results in diminished motility and flagellin secretion due to downregulation of the flagellar regulon by repressing transcription of the *flhDC* genes [42,44]. FlhDC, the master regulator of flagellar gene expression, activates transcrip-

tion of class II flagellar genes, such as *fliA* and *fliZ* [45,46]. *FliA* is a positive regulator of class III flagellar genes, including flagellin [45,47]. To determine whether reduced motility or diminished flagellin production could account for the TviA-dependent reduction in NF- κ B activation, we inactivated the *fliC* gene encoding the sole flagellin of the monophasic serovar Typhi, thereby rendering strains carrying these mutations aflagellate and non-motile. Deletion of the entire *viaB* operon (Δ *viaB* Δ *fliC* mutant, SW483) in the *fliC* background (Δ *fliC* mutant, SW359) significantly increased NF- κ B signaling in infected HeLa and HEK293 epithelial cells (Fig. S2B and S2C). Expression of TviA from a plasmid (pTVIA1) in a *viaB* *fliC* mutant reduced luciferase activity to levels comparable to the *fliC* mutant (Fig. S2B and S2C), demonstrating that TviA-dependent repression of NF- κ B activation was flagellin-independent.

Gene expression profiling experiments suggest that TviA affects transcription of T3SS-1 genes through the following signaling cascade [42]: By repressing transcription of *flhDC*, TviA down-regulates expression of *FliZ*. The regulatory protein *FliZ* is an activator of *hilA* [48–50], the master regulator of T3SS-1 genes [51,52], thus placing T3SS-1 gene expression under negative control of TviA (Fig. S2A). We therefore analyzed the effect of TviA on the transcription of a subset of regulatory, structural, and effector proteins in *S. Typhi* (Fig. S3). Consistent with previous findings, deletion of the Vi capsule biosynthesis genes alone (Δ *tviB-vexE* mutant, SW74) did not alter transcription of T3SS-1 genes [42,44]. In contrast, concomitant deletion of *tviA* and capsule biosynthesis genes (Δ *viaB* mutant, SW347) significantly enhanced transcription of the regulatory genes *flhD*, *hilA*, and *invF*, the structural component gene *pigH*, as well as the effector genes *sipA* and *sopE* (Fig. S3).

In the absence of TviA, the *S. Typhi* T3SS-1 effector protein SopE is the major inducer of NF- κ B activation in epithelial cells

We next determined which T3SS-1 effector proteins contributed to pro-inflammatory responses elicited by *S. Typhimurium* and *S. Typhi*. Previous work has demonstrated that SopE, SopE2, SopB, and SipA contribute to NF- κ B activation in epithelial cells [15–17,53]. The bacteriophage-encoded *sopE* gene is present in *S. Typhi* Ty2 but absent from *S. Typhimurium* strain ATCC 14028. To better model the contribution of TviA on attenuating T3SS-1-induced host responses, we chose to continue our studies using the *S. Typhimurium* strain SL1344, an isolate that carries the *sopE* gene. Consistent with previous reports [15–17,53], we found that simultaneous inactivation of *sopE*, *sopE2*, *sopB*, and *sipA* (*sopE sopE2 sopB sipA* mutant, SW868) reduced the ability of the *S. Typhimurium* strain SL1344 to induce NF- κ B activation to levels observed in an isogenic *S. Typhimurium* strain unable to translocate effector proteins (*invA* mutant; SW767) (Fig. S4). A *S. Typhimurium* strain only expressing SopE (*sopE2 sopB sipA* mutant, SW867) elicited considerable NF- κ B activation. A moderate NF- κ B activation was also observed with *S. Typhimurium* strains only expressing SopB (*sopE sopE2 sipA* mutant, SW972) or only expressing SipA (*sopE sopE2 sopB* mutant, SW940) (Fig. S4). Essentially no response was observed in cells infected with a SL1344 derivative that only expressed SopE2 (*sopE sopA sopB* mutant, SW973). Collectively, these data suggested that SopE was the most potent inducer of pro-inflammatory responses in this tissue culture model, while the contributions of SopB and SipA were more modest.

We next determined the potential contribution of the *S. Typhi* orthologues of these effectors to the induction of NF- κ B signaling in the absence of the *tviA* gene (*S. Typhi* Δ *viaB* mutant, SW347)

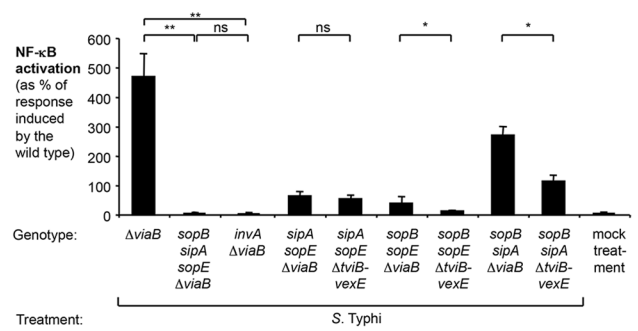


Figure 3. Effect of the regulator TviA on NF- κ B activation triggered by *S. Typhi* T3SS-1 effectors. HeLa cells permanently transfected with a NF- κ B-luciferase reporter system (HeLa 57A) were either mock treated (bacterial growth media alone) or infected with the *S. Typhi* wild type Ty2, a Δ *viaB* mutant (SW347), a *sopB sipA sopE* Δ *viaB* mutant (SW1217), an *invA* Δ *viaB* mutant (STY4), a *sipA sopE* Δ *viaB* mutant (SW1214), a *sipA sopE* Δ *tviB-vexE* mutant (SW1215), a *sopB sopE* Δ *viaB* mutant (SW1216), a *sopB sopE* Δ *tviB-vexE* mutant (SW1213), a *sopB sipA* Δ *viaB* mutant (SW1211), or a *sopB sipA* Δ *tviB-vexE* mutant (SW1212). After 5 h, luciferase activity was measured (N=4). Bars represent geometric means \pm standard error. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, not statistically significant.

doi:10.1371/journal.ppat.1004207.g003

(Fig. 3). The *sopE2* gene is a pseudogene in *S. Typhi* Ty2 and was not further analyzed. Concomitant inactivation of *sopE*, *sipA* and *sopB* in the *S. Typhi* *viaB* mutant (*sopB sipA sopE* Δ *viaB* mutant, SW1217) completely abolished NF- κ B-driven luciferase activity (Fig. 3). This indicated that, akin to the findings with the *S. Typhimurium* strain SL1344, SopE, SipA, and SopB are critical for the induction of inflammatory responses in epithelial cells upon infection with *S. Typhi*. A *S. Typhi* *viaB* *sopB sipA* mutant (SW1211) elicited pronounced NF- κ B activation, but a more modest NF- κ B activation was also observed with the *S. Typhi* *viaB* *sopE sipA* mutant (SW1214) and the *viaB* *sopE sopB* mutant (SW1216) (Fig. 3). These data suggested that SopE was the most potent inducer of pro-inflammatory responses in *S. Typhi* strains lacking the *tviA* gene while SopB and SipA contributed moderately. In contrast, diminished NF- κ B activation was observed with *S. Typhi* *tviB-vexE* mutant (carrying the *tviA* gene) and its derivatives (Fig. 3). This intricate comparison between derivatives of the *viaB* mutant and the *tviB-vexE* mutant allowed us to preclude any confounding effects expression of the Vi antigen might have on gene regulation: both the *viaB* mutant and the *tviB-vexE* mutant are non-encapsulated and only differ in their capability of expressing *tviA*. In contrast, a simple *tviA* mutant would exhibit a pleiotropic effect, i.e. it would lack the regulatory TviA protein but at the same time exhibit virtually no production of the Vi antigen [37]. Collectively, these data suggested that TviA-mediated gene regulation reduced T3SS-1 effector-triggered NF- κ B activation.

TviA reduces activation of the Rac1 and NOD1/2 signaling pathway

Since SopE triggered the most pronounced host responses in the absence of *tviA*, we focused our further analysis on this signaling pathway. Mechanistic studies in cultured epithelial cells have revealed that the bacterial guanine nucleotide exchange factor (GEF) SopE activates the Rho-family GTPase Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) [15]. Excessive stimulation of RAC1 by bacterial effectors is sensed by the nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1) [30]. Activation of NOD1 leads to phosphorylation of the receptor-

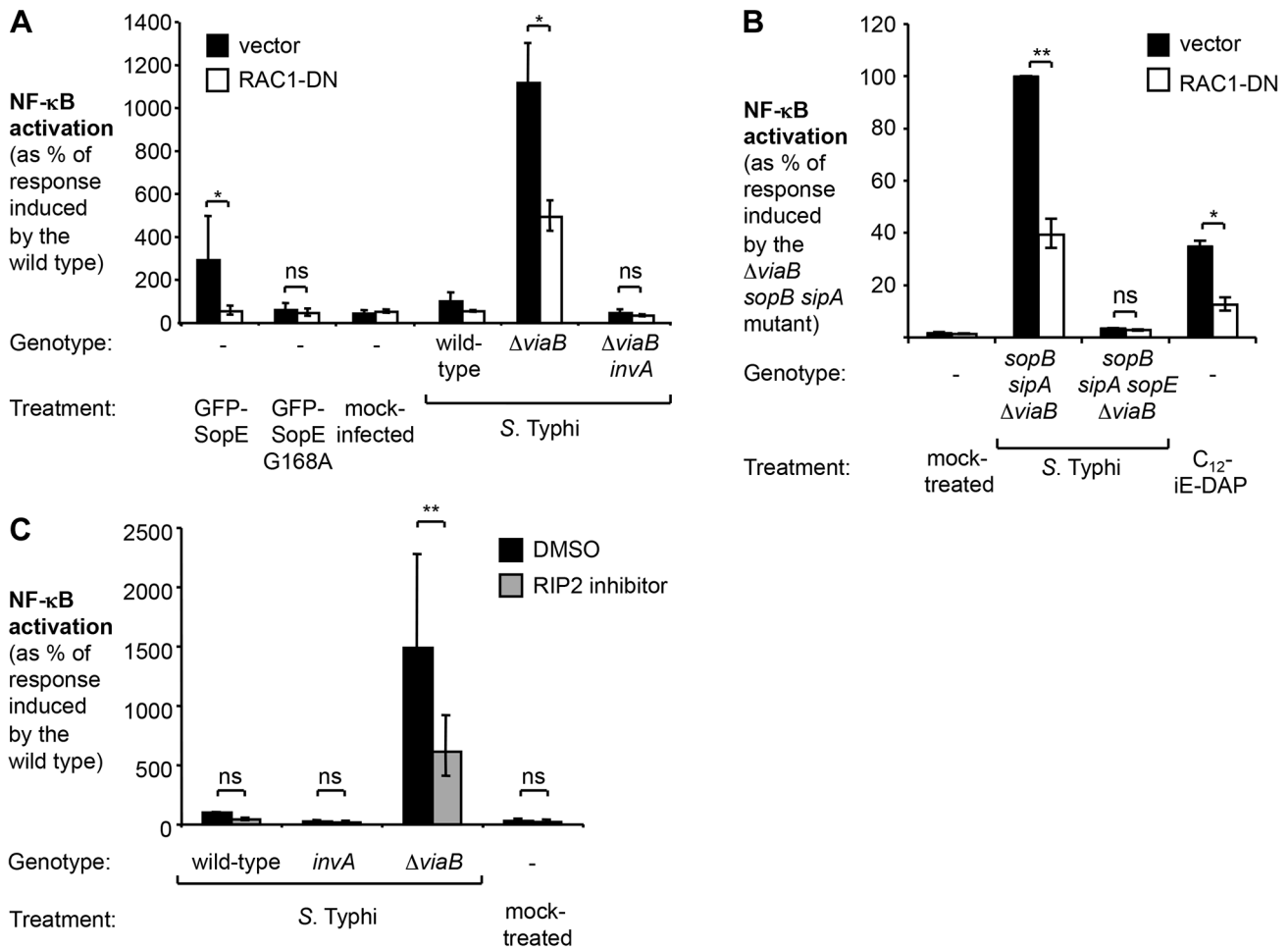


Figure 4. In the absence of *tviA*, *S. Typhi* induces NF- κ B activation in a RAC1- and RIP2-dependent manner. (A and B) HeLa cells permanently transfected with a NF- κ B luciferase reporter system (HeLa 57A) were transfected with pCMV-myc (vector, black bars) or pRAC1-DN (RAC1-DN, white bars) (A) Cells were transfected with the indicated GFP-SopE constructs or infected with the indicated *S. Typhi* strains for 5 h (N=3). (B) Cells were mock-treated, infected with the indicated *S. Typhi* strains, or treated with the NOD1 agonist C_{12} -iE-DAP (an acylated derivative of γ -D-Glu-mDAP) for 5 h. (C) HeLa 57A cells were either treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) or RIP2 inhibitor SB203580 dissolved in DMSO and subsequently infected with the indicated *S. Typhi* strains or were mock treated (bacterial growth media alone) (N=3). Bars represent geometric means \pm standard error. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, not statistically significant. doi:10.1371/journal.ppat.1004207.g004

interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIP2) and activation of NF- κ B signaling in epithelial cells [15,20,30,54]. The NOD1/2 signaling pathway in HeLa cells can also be triggered by SipA [34], although this pathway plays a lesser role in the SopE-encoding strain SL1344 (Fig. S4). Taken together, these findings raised the possibility that TviA-mediated downregulation of SopE allows *S. Typhi* to abate immune recognition by the RAC1-NOD1/2-RIP2 signaling pathway. To test this hypothesis, we abrogated RAC1 and RIP2 signaling by either ectopically expressing a dominant negative form of RAC1 (RAC1-DN) [30,55] or by treating cells with the RIP2 inhibitor (SB203580) (Fig. 4). Consistent with previous reports, ectopic expression of a GFP-SopE fusion protein alone was sufficient to induce NF- κ B activation while no upregulation of this signaling pathway was observed with a GFP-SopE construct lacking GEF activity (GFP-SopE G168A) [30,56]. Simultaneous expression of the GFP-SopE fusion protein and a RAC1-DN construct abrogated NF- κ B signaling (Fig. 4A).

Infection of HeLa cells with the *S. Typhi* wild type or the T3SS-1-deficient *viaB invA* mutant did not result in a statistically significant increase in NF- κ B activation and abrogation of RAC1 or RIP2 signaling did not further impact signaling (Fig. 4A, B, and C). In

marked contrast, infection with the *S. Typhi viaB* mutant led to a substantial upregulation of NF- κ B-driven responses. Abrogation of RAC1 or RIP2 activity significantly blunted the induction of NF- κ B responses in cells infected with the *viaB* mutant. Moreover, NF- κ B activation in cells infected with a *viaB sopB sipA* mutant was inhibited when cells were transfected with a plasmid construct encoding RAC1-DN (Fig. 4C), suggesting that SopE, translocated into host cells in the absence of TviA, could activate NF- κ B signaling in a RAC1-dependent manner. Treatment with the RIP2 inhibitor did not impact T3SS-1-mediated invasion of *S. Typhi* strains towards epithelial cells (Fig. S5), excluding the possibility that the RIP2 inhibitor inadvertently interfered with the function of the T3SS-1 machinery. Collectively, these data supported the idea that TviA restricts activation of the RAC1-NOD1/2-RIP2 signaling pathway in *S. Typhi*-infected epithelial cells.

Heterologous expression of TviA in *S. Typhimurium* blunts T3SS-1-dependent responses *in vivo*

In addition to repressing T3SS-1 genes, TviA also suppresses flagella expression (Fig. S2A) [57]. Flagellin is known to induce pro-inflammatory responses by activating TLR5 [58] and the

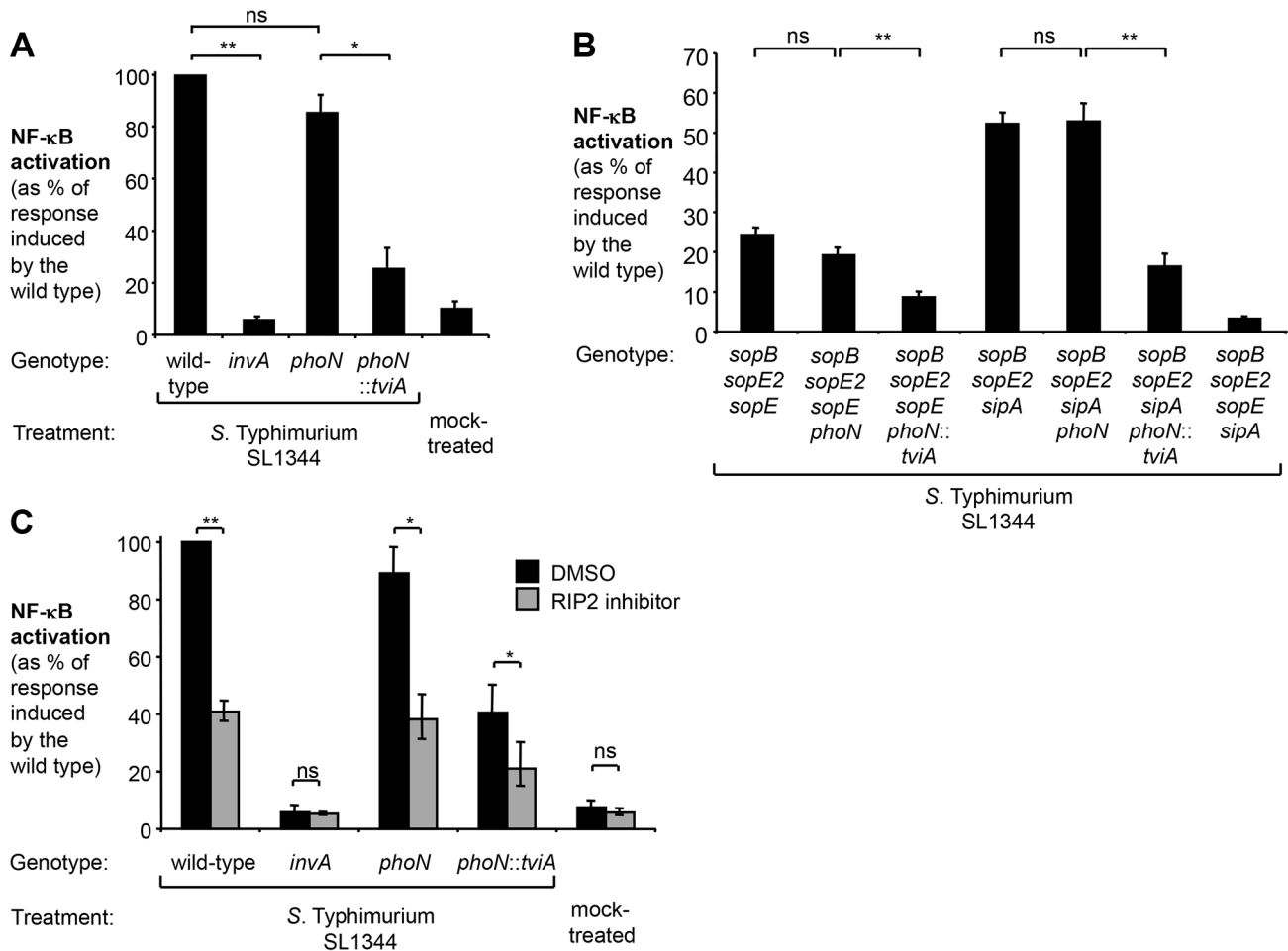


Figure 5. Expression of TviA in *S. Typhimurium* SL1344 reduces T3SS-1-driven NF-κB activation in epithelial cells. HeLa 57A cells were infected with *S. Typhimurium* or mock treated with bacterial growth media (mock treatment) and luciferase activity determined 5 h after infection ($N=4$). (A) The SL1344 wild type, an *invA* mutant (SW767), a *phoN* mutant (SW759), and a *phoN::tviA* mutant (SW760) were used to infect monolayers of HeLa 57A cells. (B) Cells were infected with the SL1344 wild type, an isogenic *sopB sopE2 sopE sipA* mutant (SW868), a *sopB sopE2 sopE* mutant (SW940), a *sopB sopE2 sipA* mutant (SW867), and derivatives thereof carrying a *phoN* (SW808; SW806) or a *phoN::tviA* (SW809; SW807) mutation, respectively. (C) Prior to infection with the indicated *S. Typhimurium* strains, cells were either treated with DMSO or the RIP2 inhibitor (SB203580) dissolved in DMSO. Bars represent geometric means \pm standard error. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ns, not statistically significant. doi:10.1371/journal.ppat.1004207.g005

NLRC4- (nucleotide-binding oligomerization domain [NOD]-like receptor [NLR] family caspase-associated recruitment domain [CARD]-containing protein 4-) inflammasome [59,60]. While our initial experiments in the bovine ligated ileal loop model suggest that TviA could mitigate mucosal inflammation (Fig. 2), it is conceivable that TviA-mediated gene regulation of flagellar biosynthesis could have affected flagellin-dependent innate immune pathways. To better study consequences of the expression of TviA on the RAC1-NOD1/2-RIP2 signaling pathway in an animal model, we therefore generated a *phoN::tviA* mutant in the *S. Typhimurium* SL1344 background (SW760). Akin to the findings with *S. Typhi*, expression of TviA in *S. Typhimurium* reduced transcription of T3SS-1 genes (Fig. S3) and the *phoN::tviA* mutant elicited significantly less ($P<0.05$) NF-κB activation than the *phoN* control strain (Fig. 5A and S6). We next introduced the *tviA* gene into SL1344 derivatives that only expressed the most potent inducers of the NF-κB pathway, SipA (*sopE sopE2 sopB phoN::tviA* mutant; SW809) and SopE (*sopE2 sopB sipA phoN::tviA* mutant; SW807). Upon infection of HeLa cells (Fig. 5B), strains carrying the *phoN::tviA* insertion elicited

significantly less luciferase activity than the respective *phoN* mutants ($P<0.01$), indicating that TviA is able to reduce the NF-κB activation elicited by the *S. Typhimurium* orthologues of SopE and SipA. Inhibition of RIP2 significantly reduced NF-κB activation levels induced by the wild-type strain or the *phoN* mutant (Fig. 5C). The modest response induced by the *phoN::tviA* mutant was further blunted by inhibition of RIP2 signaling ($P<0.05$) (Fig. 5C), suggesting that TviA-mediated regulation of T3SS-1 is partially able to avoid induction of the NOD1/2-RIP2 pathway *in vitro*.

To include any effects of TviA on flagellin-dependent pathways, we introduced the *phoN::tviA* mutation into a non-motile *S. Typhimurium* strain lacking phase 1 and 2 flagellins, FliC and FljB (*fliC fljB* mutant, SW762) (Fig. 6A). Both the *fliC fljB* mutant and the *fliC fljB phoN* mutant (SW793) elicited significant levels of NF-κB activation in cultured epithelial cells (Fig. 6A), while this response was greatly reduced in cells infected with the *fliC fljB phoN::tviA* mutant (SW764). Inactivation of the essential T3SS-1 gene *invA* completely abolished the ability to induce NF-κB signaling (Fig. 6A).

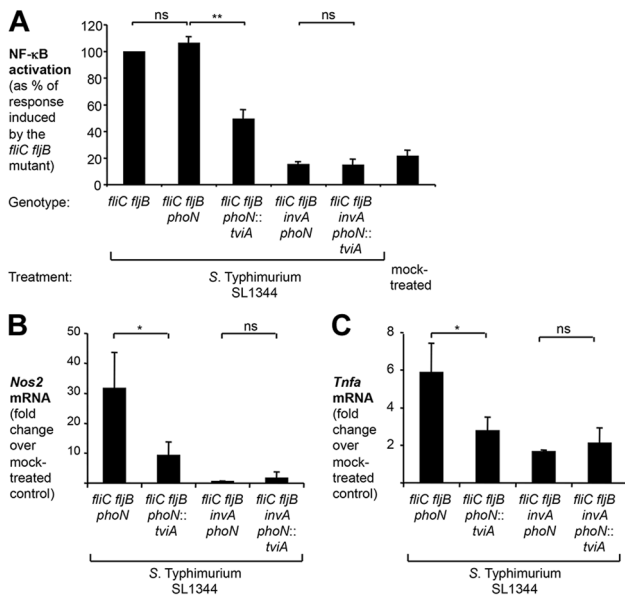


Figure 6. TviA reduces T3SS-1-dependent, flagellin-independent inflammatory responses in the cecal mucosa. (A) HeLa 57A cells were infected with an aflagellate SL1344 *fliC fliB* mutant (SW762), a *fliC fliB phoN* mutant (SW793), a *fliC fliB phoN::tviA* mutant (SW764) and derivatives carrying an additional mutation in *invA* (SW794; SW766). NF-κB activation was determined as described above. (B and C) Groups of streptomycin-pretreated C57BL/6 mice were intragastrically inoculated with either a *S. Typhimurium* SL1344 *fliC fliB phoN* mutant (N=8), a *fliC fliB phoN::tviA* mutant (N=8), a *fliC fliB phoN invA* mutant (N=4), a *fliC fliB phoN::tviA invA* mutant (N=4), or LB broth (mock-treated; N=3). 12 h after infection, the relative abundance of *Nos2* (B) and *Tnfa* (C) mRNA was determined by qRT-PCR. Bars represent geometric means ± standard error. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns, not statistically significant. doi:10.1371/journal.ppat.1004207.g006

To directly assess the ability of TviA to impede inflammatory processes in the intestinal mucosa, we used the Streptomycin pretreated mouse model [61]. In this model, detection of cytosolic access by the *S. Typhimurium* T3SS-1 through the NOD1/2 signaling pathway contributes to intestinal inflammation early during infection [30,34,62]. Compared to mock infected mice, transcript levels of the pro-inflammatory genes *Nos2*, encoding inducible nitric oxide synthase (iNOS), and *Tnfa*, encoding tumor necrosis factor (TNF)-α, were significantly ($P < 0.05$) elevated in the cecal mucosa at 12 hours after infection with a non-flagellated *S. Typhimurium phoN fliC fliB* mutant (SW793) (Fig. 6B and C). Introduction of the *S. Typhi tviA* gene into a *S. Typhimurium fliC fliB* mutant (*phoN::tviA fliC fliB* mutant, SW764) significantly ($P < 0.05$) reduced pro-inflammatory gene expression (Fig. 6B and 6C), but not bacterial numbers recovered from intestinal contents or Peyer’s patches (Fig. S7). Inflammatory responses observed in the cecal mucosa at this early time point were T3SS-1-dependent, because introduction of a mutation in *invA* abrogated the ability of *S. Typhimurium* to elicit pro-inflammatory gene expression. Collectively, these data suggested that TviA represses T3SS-1-dependent, early inflammatory responses *in vivo* through a flagellin-independent mechanism.

Discussion

S. Typhi invades the intestinal mucosa without triggering the massive neutrophil influx observed during gastroenteritis caused by non-typhoidal serovars. Here we show that one mechanism for attenuating host responses is a TviA-mediated repression of T3SS-

1, a virulence factor known to induce potent inflammatory host responses. Effector molecules translocated by the T3SS-1 into the host cell cytosol activate Rho-family GTPases [15–17]. The activation of Rho-family GTPases is a pathogen-induced process that is sensed by NOD1 [21,30], which ultimately results in the activation of pro-inflammatory responses *in vitro* [15,20,54] and *in vivo* [30,62]. However, *S. Typhi* requires a functional T3SS-1 to invade the intestinal epithelium during infection [27]. Our data suggest that *S. Typhi* might have evolved to invade the intestinal epithelium without inducing a potent antibacterial inflammatory response by regulating T3SS-1 expression in a TviA-dependent manner. Osmoregulation prevents expression of TviA in the intestinal lumen, which renders *S. Typhi* invasive [42] (Fig. 2A). However, TviA expression is rapidly upregulated upon entry into tissue [63], resulting in repression of T3SS-1 and flagella expression while biosynthesis of the Vi capsule is induced [42,44]. Here we show that TviA prevented NF-κB activation in epithelial cells by reducing T3SS-1-dependent activation of RAC1. Furthermore, the TviA-mediated reduction of T3SS-1-dependent inflammatory responses elicited at early time points in animal models was independent of flagella and the Vi capsule. These data support the hypothesis that TviA attenuates inflammation because it rapidly turns off T3SS-1 expression upon entry into tissue, thereby concealing a pathogen-induced process from the host.

Bovine ligated ileal loops are suited to model the initial 12 hours of host pathogen interaction, a time period during which inflammatory responses are largely T3SS-1-dependent [22,23,64]. Similarly, in the mouse colitis model, inflammatory responses elicited in the cecum at early time points (i.e. during the first 2 days) after infection are largely T3SS-1-dependent [61,65,66]. However, mechanisms independent of T3SS-1 are responsible for cecal inflammation observed at later time points (i.e. at days 4 and 5 after infection) in the mouse colitis model [65]. Expression of the *S. Typhi* Vi capsular polysaccharide in *S. Typhimurium* leads to an attenuation of these T3SS-1-independent inflammatory responses in the mouse colitis model [41], by reducing complement activation and TLR4 signaling [67,68]. Thus the *viaB* locus reduces intestinal inflammation by multiple different mechanisms (Fig. S2A). A TviA-mediated repression of T3SS-1 reduces early inflammatory responses while the Vi capsular polysaccharide attenuates responses generated through T3SS-1-independent mechanisms at later time points. It is tempting to speculate that the result of these immune evasion mechanisms is a reduction in the intestinal inflammatory response that could contribute to differences in disease symptoms caused by typhoidal and non-typhoidal serotypes.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol on mouse experiments was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of California, Davis (Permit Number: 16179). The protocol on calf experiments was approved by the Institutional Committee at the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil (Permit Number: CETEA 197/2008).

Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains, including relevant properties, are listed in table 1. Unless noted otherwise, bacteria were aerobically grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain designation	Relevant characteristics ^a /Genotype	Source/Reference
<i>S. Typhi</i>		
Ty2	Wild-type strain, Vi ⁺	ATCC 700931 ^b
STY2	Ty2 Δ <i>viaB</i> ::Kan ^R	[13]
STY4	Ty2 Δ <i>viaB</i> ::Kan ^R <i>invA</i> ::pINV5 (Cm ^R)	[13]
SW74	Ty2 Δ <i>tviB-vexE</i> ::Cm ^R , Vi ⁻	[57]
SW222	Ty2 <i>invA</i> ::pINV5 (Cm ^R)	[57]
SW347	Ty2 Δ <i>viaB</i> , Vi ⁻	[42]
SW359	Ty2 Δ <i>fliC</i>	[42]
SW398	Ty2 Δ <i>viaB</i> Δ <i>fliC</i> <i>invA</i> ::pSW127	This study
SW483	Ty2 Δ <i>viaB</i> Δ <i>fliC</i>	[42]
SW611	Ty2 Δ <i>tviB-vexE</i> ::Cm ^R <i>invA</i> ::pSW127	This study
SW904	Ty2 Δ <i>tviB-vexE</i> , Vi ⁻	This study
SW1207	Ty2 Δ <i>viaB</i> <i>sopB</i> ::MudJ	This study
SW1208	Ty2 <i>tviB-vexE</i> <i>sopB</i> ::MudJ	This study
SW1209	Ty2 Δ <i>viaB</i> Δ <i>sopE</i>	This study
SW1210	Ty2 <i>tviB-vexE</i> Δ <i>sopE</i>	This study
SW1211	Ty2 Δ <i>viaB</i> <i>sopB</i> ::MudJ Δ <i>sipA</i>	This study
SW1212	Ty2 Δ <i>tviB-vexE</i> <i>sopB</i> ::MudJ Δ <i>sipA</i>	This study
SW1213	Ty2 Δ <i>tviB-vexE</i> <i>sopB</i> ::MudJ Δ <i>sopE</i>	This study
SW1214	Ty2 Δ <i>viaB</i> Δ <i>sopE</i> Δ <i>sipA</i>	This study
SW1215	Ty2 Δ <i>tviB-vexE</i> Δ <i>sopE</i> Δ <i>sipA</i>	This study
SW1216	Ty2 Δ <i>viaB</i> <i>sopB</i> ::MudJ Δ <i>sopE</i>	This study
SW1217	Ty2 Δ <i>viaB</i> <i>sopB</i> ::MudJ Δ <i>sipA</i> Δ <i>sopE</i>	This study
<i>S. Typhimurium</i>		
AJB715	IR715 <i>phoN</i> ::Kan ^R	[73]
CS019	ATCC14028 <i>phoN</i> ::Tn10dCm	[74]
IR715	ATCC14028 Nal ^R	[75]
SL1344	Strep ^R	[76]
SPN305	IR715 Δ <i>fliC</i> ::pSPN29	[42]
SW284	IR715 <i>phoN</i> : Cm ^R	[42]
SW399	IR715 <i>invA</i> ::pSW127	[71]
SW474	IR715 <i>phoN</i> :: <i>tviA</i> -Cm ^R	[42]
SW562	IR715 Δ <i>invA</i> ::Tet ^R	[77]
SW737	IR715 <i>phoN</i> ::Kan ^R Δ <i>invA</i> ::Tet ^R	This study
SW751	IR715 <i>phoN</i> ::pSW208	This study
SW759	SL1344 <i>phoN</i> ::Cm ^R	This study
SW760	SL1344 <i>phoN</i> :: <i>tviA</i> -Cm ^R	This study
SW761	SL1344 Δ <i>fliC</i>	This study
SW762	SL1344 Δ <i>fliC</i> <i>fijB5001</i> ::MudJ	This study
SW764	SL1344 Δ <i>fliC</i> <i>fijB5001</i> ::MudJ <i>phoN</i> :: <i>tviA</i> -Cm ^R	This study
SW766	SL1344 Δ <i>fliC</i> <i>fijB5001</i> ::MudJ <i>phoN</i> :: <i>tviA</i> -Cm ^R Δ <i>invA</i> ::Tet ^R	This study
SW767	SL1344 Δ <i>invA</i> ::Tet ^R	This study
SW793	SL1344 Δ <i>fliC</i> <i>fijB5001</i> ::MudJ <i>phoN</i> ::pSW208	This study
SW794	SL1344 Δ <i>fliC</i> <i>fijB5001</i> ::MudJ <i>phoN</i> ::pSW208 Δ <i>invA</i> ::Tet ^R	This study
SW798	SL1344 <i>sopB</i> ::MudJ	[30]
SW800	SL1344 <i>sopE2</i> ::pSB1039	[30]
SW806	SL1344 Δ <i>sipA</i> <i>sopB</i> ::MudJ <i>sopE2</i> ::pSB1039 <i>phoN</i> ::Tn10dCm	This study
SW807	SL1344 Δ <i>sipA</i> <i>sopB</i> ::MudJ <i>sopE2</i> ::pSB1039 <i>phoN</i> :: <i>tviA</i> -Cm ^R	This study
SW808	SL1344 Δ <i>sopE</i> <i>sopB</i> ::MudJ <i>sopE2</i> ::pSB1039 <i>phoN</i> ::Tn10dCm	This study
SW809	SL1344 Δ <i>sopE</i> <i>sopB</i> ::MudJ <i>sopE2</i> ::pSB1039 <i>phoN</i> :: <i>tviA</i> -Cm ^R	This study

Table 1. Cont.

Strain designation	Relevant characteristics ^a /Genotype	Source/Reference
SW839	SL1344 $\Delta sipA::pSW244$	This study
SW867	SL1344 $\Delta sipA\ sopB::MudJ\ sopE2::pSB1039$	[30]
SW868	SL1344 $\Delta sipA\ \Delta sopE\ sopB::MudJ\ sopE2::pSB1039$	[30]
SW940	SL1344 $\Delta sopE\ sopB::MudJ\ sopE2::pSB1039$	This study
SW972	SL1344 $\Delta sipA\ \Delta sopE\ sopE2::pSB1039$	This study
SW973	SL1344 $\Delta sipA\ \Delta sopE\ sopB::MudJ$	[30]
SW974	IR715 $\Delta sipA::pSW244$	[30]
SW976	SL1344 $\Delta sopE$	[78]
SW977	SL1344 $\Delta sopE::pSW245$	This study
SW1009	SL1344 $\Delta sipA\ \Delta sopE$	[30]
TH170	IR715 $phoN::viaB$	[41]
<i>E. coli</i>		
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\ \Phi80lacZ\ \Delta M15\ \Delta lacX74\ recA1\ araD139\ \Delta(ara\ leu)\ 7697\ galU\ galK\ rpsL$ (Strep ^R) <i>endA1 nupG</i>	Life Technologies
DH5 α λ pir	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r ⁻ m ⁻) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1</i> $\Delta(lacZYA-argF)U169\ \Phi80lacZ\ \Delta M15\ \lambda$ pir	Laboratory strain collection
S17-1 λ pir	<i>recA1 thi pro hsdR</i> (r ⁻ m ⁻) <i>zxx::RP4 2-(Tet^R::Mu) (Kan^R::Tn7) \lambda</i> pir	[79]

^aCm^R: Chloramphenicol resistance; Kan^R: Kanamycin resistance; Nal^R: Nalidixic acid resistance; Strep^R: Streptomycin resistance; Tet^R: Tetracycline resistance (*tetRA*).
^bAmerican Type Culture Collection, Manassas, VA.
 doi:10.1371/journal.ppat.1004207.t001

extract, 10 g/l NaCl) or LB agar (15 g/l agar). To induce expression of *tviA* and Vi capsule biosynthesis genes, an overnight culture in LB broth was diluted 1:50 in tryptone yeast extract (TYE) broth (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract) or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) as indicated and incubated aerobically at 37°C for 3 h. When appropriate, antibiotics were added to LB broth cultures or LB agar plates at the following

concentrations: carbenicillin (0.1 mg/ml), chloramphenicol (0.03 mg/ml), kanamycin (0.05 mg/ml), nalidixic acid (0.05 mg/ml), and tetracycline (0.01 mg/ml).

Construction of plasmids

Standard cloning techniques were performed to generate the plasmids listed in table 2. Cloning vectors and *ori*(R6K)-based

Table 2. Plasmids used in this study.

Plasmid designation	Relevant characteristics ^a /Genotype	Source/Reference
pCMV-myc	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla</i> P _{CMVIE} myc-tag	Clontech
pCR2.1	Cloning vector	Life Technologies
pEP185.2	<i>ori</i> (R6K) <i>mobRP4 cat</i>	[80]
pEGFP-C1	<i>ori</i> (pMB1) Kan ^R P _{CMVIE} EGFP	Clontech
pGFP-SopE	<i>sopE</i> cloned into pEGFP-C1; N-terminal GFP tag	[30]
pGFP-SopE-G168A	G168A amino acid substitution in SopE in pEGFP-C1; N-terminal GFP tag	[30]
pNFkB-luc	NF- κ B -responsive luciferase reporter plasmid	[81]
pRAC1-DN	Dominant-negative form of hRAC1 cloned into pCMV-myc; T17N amino acid substitution; N-terminal myc tag.	[30]
pRDH10	<i>ori</i> (R6K) <i>mobRP4 cat tetC sacRB</i>	[82]
pRI203	<i>Y. pseudotuberculosis</i> invasin gene in pREG153	[83]
pSW28	Upstream and downstream regions of the <i>tviBCDEvexABCDE</i> region of <i>S. Typhi</i> Ty2 in pGP704	[57]
pSW208	Internal fragment of the <i>S. Typhimurium phoN</i> gene cloned into pEP185.2	This study
pSW233	Upstream and downstream regions of the <i>tviBCDEvexABCDE</i> region of <i>S. Typhi</i> Ty2 in pRDH10	This study
pSW245	Upstream and downstream region of the <i>S. Typhimurium sopE</i> gene in pRDH10	[78]
pTK-LacZ	Normalization of transfection efficiency	[84]
pTVIA1	<i>tviA</i> under control of its native promoter in pWSK29	[38]
pWSK29	<i>ori</i> (pSC101) <i>bla</i>	[85]

doi:10.1371/journal.ppat.1004207.t002

Table 3. Primers used in this study.

Target	Sequence ^c	Reference
Mutagenesis		
<i>S. Typhimurium phaN</i>	5'-TCTAGACGATGGAAACAAGCTGC-3'	This study
	5'-GAGCTCTACTAATGCCAGAAGTGT-3'	
Real time PCR		
<i>Salmonella gmk</i>	5'-TTGGCAGGGAGGCGTTT-3'	[86]
	5'-GCGCGAAGTGCCGTAGTAAT-3'	
<i>Salmonella flhD</i>	5'-ACAGCGTTTGATCGTCCAG-3'	[63]
	5'-GTTTGCCATCTCTCGTTGA-3'	
<i>Salmonella hilA</i>	5'-ATTAAGGCGACAGAGCTGGA-3'	[42]
	5'-GAATAGCAAACCTCCGACGA-3'	
<i>Salmonella invF</i>	5'-GTTGTCGCACCAGTATCAGG-3'	This study
	5'-TCGGATTCAGCATATGTCGT-3'	
<i>Salmonella prgH</i>	5'-CACTGAACGGCTGTGAGTTT-3'	This study
	5'-CGGCAGGTATATCAGGGAGT-3'	
<i>Salmonella sipA</i>	5'-TTCAAATAATGTCCCGGTA-3'	This study
	5'-TTCATCAGTAGCGTCTTCGC-3'	
<i>Salmonella sopE</i>	5'-CAACACACTTTCACCGAGGA-3'	This study
	5'-ATCATTGAGCGTTTGAAGCA-3'	
Murine <i>Gapdh</i>	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	[87]
	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	
Murine <i>Tnfa</i>	5'-AGCCAGGAGGGAGAACGAAAC-3'	[68]
	5'-CCAGTGAGTGAAAGGGACAGAACC-3'	
Murine <i>Nos2</i>	5'-TTGGTCTTGTCTCACTCCACGG-3'	[88]
	5'-CCTCTTTCAGGTCACCTTGGTAGG-3'	

^crestriction endonuclease cleavage sites are underlined.
doi:10.1371/journal.ppat.1004207.t003

suicide plasmids were routinely maintained in *E. coli* TOP10 and DH5 α λ pir, respectively.

An internal fragment of the *phaN* coding sequence was PCR amplified from the *S. Typhimurium* IR715 chromosome using the primers listed in table 3, subcloned into pCR2.1 (TOPO TA cloning kit, Life Technologies), and cloned into pEP185.2 utilizing the unique XbaI and SacI restriction sites to give rise to pSW208. To generate pSW233, pSW28 was digested with EcoRI and the DNA fragment comprising the joint upstream- and downstream regions of the *tviB* and *vexE* genes, respectively, was cloned into the EcoRI site of pRDH10.

Generation of mutants by allelic exchange

Plasmids were introduced into S17-1 λ pir and conjugation performed as described previously [57]. The unmarked *S. Typhi* Δ *tviB-vexE* mutant SW904 was constructed by inserting the plasmid pSW233 into the STY2 mutant chromosome, selecting for single crossover events (creating merodiploids) on LB agar plates containing Cm and Kan. Sucrose selection was performed as described previously [69] to select for a second crossover event, thus effectively deleting the *tviBCDEvexABCDE* genes, yielding SW904. The deletion was confirmed by PCR. To facilitate transduction of the unmarked Δ *sopE* mutation, pSW245 was introduced in this locus in the SW976 chromosome by conjugation with S17-1 λ pir as the donor strain, creating SW977 as an intermediate.

Construction of mutants by P22-mediated generalized phage transduction

Phage P22 HT *int-105* was utilized for generalized phage transduction in *S. Typhimurium* as described previously [70]. For *S. Typhi* recipients, a similar protocol was followed except the multiplicity of infection (MOI) was increased to 100.

A phage lysate of SW399 was used to transduce the *invA*::pSW127 mutation into SW483 and SW74, thus generating the *S. Typhi* Δ *viaB* Δ *fliC* *invA* mutant (SW398) and the Δ *tviB-vexE* *invA* mutant (SW611). SW1207 and SW1208 were created by transducing the *sopB*::*MudJ* mutation from SW798 into the Δ *viaB* mutant (SW347) and the Δ *tviB-vexE* mutant (SW904), respectively. The *S. Typhi* Δ *viaB* Δ *sopE* (SW1209), Δ *tviB-vexE* Δ *sopE* (SW1210), Δ *viaB* *sopB*::*MudJ* Δ *sopE* (SW1216), and Δ *tviB-vexE* *sopB*::*MudJ* Δ *sopE* (SW1213) mutants were constructed by transducing the Δ *sopE*::pSW245 mutation from SW977 into SW347, SW904, SW1207, and SW1208, respectively. Subsequent sucrose selection allowed selecting for mutants that had lost the plasmid by allelic exchange and generated a clean Δ *sopE* mutation, thus creating SW1209, SW1211, SW1216, and SW1213, respectively. Similarly, a P22 lysate of SW839 was used to transduce the Δ *sipA*::pSW244 mutation (SW839) into SW1207, SW1208, SW1209, and SW1210. The intermediates were subjected to sucrose selection, thus creating the clean Δ *sipA* mutation of strains SW1211, SW1212, SW1214, and SW1215, respectively. The Δ *viaB* *sopB*::*MudJ* Δ *sipA* Δ *sopE* mutant (SW1217) was generated through

transduction of the Δ *sopE*::pSW245 mutation from SW977 into the SW1211 chromosome and sucrose selection.

The *S. Typhimurium* SL1344 derivatives SW759 and SW760 were established by transducing the *phaN*::Cm^R and *phaN*::*tvIA*-Cm^R mutations from SW284 and SW474 into the SL1344 wild type. Transduction of the Δ *fliC*::pSPN29 from SPN305 into the SL1344 wild type and subsequent sucrose selection gave rise to the SL1344 *fliC* deletion mutant SW761. Subsequent introduction of the *fliB5001*::MudJ into this strain led to the SL1344 Δ *fliC* *fliB5001*::MudJ mutant (SW762). To construct SW764 and SW793, the *phaN*::*tvIA*-Cm^R (SW474) and *phaN*::pSW208 (SW751) mutations were transduced separately into SW762. Invasion-deficient derivatives of these strains were generated by transducing the *invA*::Tet^R mutation from SW562 into SW764, SW793, and SL1344, thus creating strains SW766, SW794, and SW767, respectively. SW806, SW807, SW808, and SW809 were generated by transducing the *phaN*::Tn10dCm (CS019) or *phaN*::*tvIA*-Cm^R (SW474) into SW867 or SW940. The Δ *si-pA*::pSW244 mutation (SW974) was moved into the SL1344 wild type to create SW839. SW940 was established by transduction of the *sopB*::MudJ mutation (SW798) into SW976 and subsequent introduction of the *sopE2*::pSB1039 mutation (SW800). A P22 phage lysate of SW800 was used to create SW972 using SW1009 as the recipient strain. The *phaN*::Kan^R mutation from AJB715 was transduced into SW562 to give rise to the *phaN*::Kan^R *invA*::Tet^R mutant (SW737).

Tissue culture experiments

HeLa 57A cells [29,34] were generously provided by R. T. Hay (the Wellcome Trust Centre for Gene Regulation and Expression, College of Life Sciences, University of Dundee, United Kingdom). HEK-293 cells were obtained from ATCC (ATCC CRL-1573). Both cell lines were routinely cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies). For NF-κB activation and invasion experiments, cells were seeded in 24-well plates and 48-well plates (Corning) at densities of 1×10⁵ cells/well and 2×10⁵ cells/well, respectively, and incubated for 24 h prior to subsequent experiments.

Measurement of NF-κB activation in epithelial cells

S. Typhi and *S. Typhimurium* strains were pre-cultured in TYE broth as described above. HeLa 57A cells or HEK-293 cells transfected with a NF-κB -luciferase reporter construct were infected with the indicated strains at a final concentration of approximately 10⁶ colony forming units (CFU)/ml. To synchronize the infection, plates were centrifuged for 5 min at 500 g at room temperature. After 3 h, cells were washed with DPBS and incubated at 37°C for an additional 2 h in the presence of DMEM containing 10% FBS. Cells were washed in DPBS, lysed in 0.1 ml of reporter lysis buffer (Promega), and firefly luciferase activity was measured using the luciferase assay system (Promega) in a FilterMax3 microplate reader (Molecular Devices). Results are expressed as percentage of maximum signal elicited in each individual assay. In some experiments, cells were treated 30 min prior to infection until the end of the experiment with either DMSO (vehicle control) or the RIP2-inhibitor SB203580 at a final concentration of 10 μM dissolved DMSO. The NOD1 agonist C₁₂-iE-DAP (Invivogen) was added a final concentration of 100 ng/ml.

For transfection assays [34], HeLa 57A cells were grown to a confluency of about 60% and transiently transfected with a total of 250 ng of plasmid DNA, consisting of 50 ng of the β-galactosidase-encoding vector pTK-LacZ, and either 200 ng of pCMV-

myc (control vector) or 100 ng pRAC1-DN and 100 ng of control vector. For co-transfection with pGFP-SopE constructs, 50 ng of pTK-LacZ, 10 ng of the pGFP-SopE plasmid, 90 ng of pEGFP (empty vector), and 100 ng of either pCMV-myc or pRAC1-DN was added. HEK-293 cells were transfected with 25 ng of pTK-LacZ and 25 ng of pNFκB-luc. 48 h after transfection, cells were infected with the indicated *Salmonella* strains or mock-treated (LB broth) as described above. Efficiency of transfection was normalized by adjusting luciferase values to β-galactosidase values.

Invasion assays

Invasiveness of the indicated *Salmonella* strains was determined using a Gentamicin protection assay as described previously [71]. Briefly, HeLa 57A cells were infected at a MOI of 5 with *Salmonella* strains pre-cultured in TYE broth. After 1 h, cells were washed and media containing 0.1 mg/ml Gentamicin was added for 90 min. Diluted cell lysates (0.5% Triton-X-100) were spread on LB agar plates to determine the number of CFU per well. Invasiveness was calculated as percentage of recovered bacteria compared to the inoculum.

Bacterial gene expression analysis

Overnight cultures of the indicated *S. Typhi* and *S. Typhimurium* strains were diluted 1:50 in TYE broth and incubated at 37°C for 3 h. Total RNA was extracted from approximately 2×10⁹ CFU using the Aurum Total RNA Mini Kit (Biorad). 1 μg of total RNA was subjected to an additional DNase treatment (DNA-free kit, Life Technologies) and converted to cDNA using MuLV reverse transcriptase (Life Technologies) in a 25 μl volume as described previously [71]. 4 μl of this cDNA was used as the template for real time PCR analysis with the primers listed in table 3. Data was acquired on a Viia 7 real-time PCR instrument (Life Technologies). Relative target gene expression was normalized to mRNA levels of the house keeping gene *gmk*, encoding guanylate kinase ($\Delta\Delta Ct$ method). DNA contamination was less than 1% for all amplicons as determined by a separate RT-PCR mock reaction lacking reverse transcriptase.

Bovine ligated ileal loop model

Salmonella Typhimurium was cultured in LB broth at 37°C under agitation, followed by subculture in fresh LB (without antibiotics) for 3 hours, at 37°C under agitation. Four 3–4 week-old male healthy *Salmonella*-free Holstein calves were used in this study. Ligated ileal loops were surgically prepared as previously described [23]. Ligated loops were mock treated with intraluminal injection of sterile LB broth or inoculated with 3 ml of suspensions containing 1×10⁸ CFU of the *S. Typhimurium* ATCC14028 *phaN* mutant (AJB715), a *phaN*::*viaB* mutant (TH170), a *phaN*::*tvIA* mutant (SW474), or a *phaN invA* mutant (SW737). Ligated loops were surgically removed at 5 h after infection for tissue sampling and measurement of intraluminal fluid accumulation. Samples containing the intestinal mucosa and the associated lymphoid tissue were collected with a 6 mm biopsy punch. Each intestinal biopsy was kept in sterile PBS with 50 μg/ml of gentamicin for 1 h, homogenized in 2 ml of PBS, serially diluted, and plated on LB agar plates containing nalidixic acid. Additional biopsies were fixed by immersion in 10% buffered formalin, processed for paraffin embedding, cut and stained with hematoxylin and eosin. Histopathologic changes including hemorrhage, neutrophilic infiltration, edema, and necrosis and/or apoptosis were scored from 0 to 3 (0 for absence of lesions, and 1, 2, or 3 for mild, moderate, or severe lesion, respectively) for a combined total score ranging from 0 to 12.

Mouse colitis model

Animals were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor), housed under specific-pathogen-free conditions and provided with water and food *ad libitum*. Groups of female, 9–12 week old C57BL/6 mice were orally treated with 20 mg Streptomycin. After 24 h, these mice were inoculated as described previously [61] with either 0.1 ml LB broth (mock treatment) or 1×10^9 CFU of the *S. Typhimurium* SL1344 *fliC fliB phaN* mutant (SW793), the *fliC fliB phaN::tviA* mutant (SW764), the *fliC fliB phaN invA* mutant (SW794), or the *fliC fliB phaN::tviA invA* mutant (SW766) suspended in 0.1 ml LB broth. 12 h after infection, animals were euthanized and tissues were collected. The bacterial load was determined by spreading serial 10-fold dilutions of homogenates on LB agar plates containing the appropriate antibiotics. Flash-frozen cecal tissue was homogenized in a Mini-beadbeater (Biospec Products) and RNA was extracted by the TRI reagent method (Molecular Research Center). cDNA was generated using MuLV reverse transcriptase and reverse transcription reagents (Life Technologies). SYBR Green (Life Technologies)-based real-time PCR was performed as described previously [72] using the primers listed in table 3. Data was acquired by a ViiA 7 real-time PCR system (Life Technologies) and analyzed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$ method). Murine target gene transcription within each sample was normalized to the respective levels of *Gapdh* mRNA.

Statistical analysis

Data obtained from tissue culture experiments, bacterial gene transcription experiments, and the bovine ligated ileal loop model was log-transformed prior to analysis with a paired Student's *t*-test. To determine statistical significance for relative mucosal mRNA transcription and tissue bacterial load between treatment groups, an unpaired Student's *t*-test was employed.

Supporting Information

Figure S1 TviA reduces T3SS-1-induced inflammatory responses independent of bacterial entry into host cells.

(A) Genetic organization of the *viaB* operon in *S. Typhi* Ty2. (B) The *S. Typhi* Ty2 wild-type strain, a $\Delta viaB$ mutant (SW347), a $\Delta tviB-vexE$ mutant (SW74), a $\Delta viaB invA$ mutant (STY4), and a $\Delta tviB-vexE invA$ mutant (SW611) cultured in DMEM were used to infect HeLa57 cells. NF- κ B activation was determined after 5 h ($N = 4$). (C and D) HeLa 57A cells were infected with the *S. Typhi* Ty2 wild-type strain, a $\Delta viaB$ mutant (SW347), a $\Delta tviB invA$ mutant (STY4), or a $\Delta viaB invA$ mutant harboring pRI203 ($N = 3$) precultured in TYE broth. (C) Cells were infected at a multiplicity of infection of 5 for 1 h and extracellular bacteria killed by treatment with Gentamicin for 90 min. Recovered bacterial numbers were standardized to the number of the bacteria in the inoculum. (D) To determine NF- κ B activation, luciferase activity measured 5 h after infection ($N = 4$). Bars represent geometric means \pm standard error. **, $P < 0.01$; ns, not statistically significant. (TIF)

Figure S2 TviA reduces T3SS-1-induced NF- κ B activation independent of flagellin expression.

(A) Schematic representation of the TviA regulatory network in *S. Typhi* and effect on host signaling pathways. (B and C) HeLa 57A cells (B) or HEK-293 cells transiently transfected with a NF- κ B-dependent reporter plasmid (pNF κ B-luc) (C) were infected with a *S. Typhi* $\Delta fliC$ mutant (SW359), a $\Delta fliC \Delta viaB$ mutant (SW483), derivatives carrying the cloning plasmids pWSK29 (pWSK) or the plasmid pTVIA1, and a $\Delta fliC \Delta viaB invA$ mutant (SW398). Luciferase

activity was quantified 5 h after infection to determine NF- κ B activation levels ($N = 3$). Bars represent geometric means \pm standard error. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. (TIF)

Figure S3 Effect of TviA on bacterial gene expression *in vitro*. The *S. Typhi* wild type Ty2 (WT), a $\Delta viaB$ mutant (SW347), a $\Delta tviB-vexE$ mutant (SW74), the *S. Typhimurium* wild-type SL1344, a SL1344 *phaN* mutant (SW759), a SL1344 *phaN::tviA* mutant (SW760), the *S. Typhimurium* 14028 Nal^R wild type (IR715), a 14028 Nal^R *phaN* mutant (AJB715), and a 14028 Nal^R *phaN::tviA* (SW474) were cultured in TYE broth for 3 h. RNA was extracted and qRT-PCR performed to determine the relative abundance of *flhD* (A), *hilA* (B), *invF* (C), *prgH* (D), *sipA* (E), and *sopE* (F) mRNA. Data presented is fold change over the abundance of mRNA recovered from the respective wild-type strain after standardization to the housekeeping gene *gmk*. The dotted line indicates no change in gene expression. Bars represent geometric means from 3 (*S. Typhimurium*) or 4 (*S. Typhi*) independent experiments \pm standard error. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not statistically significant. (TIF)

Figure S4 Contribution of SopE, SipA, SopB, and SopE2 to NF- κ B activation in human epithelial cells.

HeLa 57A cells were treated with media only (mock treatment) or infected with the indicated *S. Typhimurium* SL1344 derivatives. Certain *Salmonella* strains lacked defined T3SS-1 effector proteins to analyze the responses induced by SopB (light grey bar), SipA (white bar), and SopE (dark grey bar). NF- κ B activation was assessed 5 h after infection based on a NF- κ B-driven luciferase reporter system ($N = 4$). Bars represent geometric means \pm standard error. **, $P < 0.01$; ns, not statistically significant. (TIF)

Figure S5 Inhibition of RIP2 signaling does not affect invasiveness of *S. Typhi* strains.

HeLa 57A cells pretreated with DMSO or RIP2 inhibitor (SB203580; dissolved in DMSO) were infected with the indicated *S. Typhi* strains at a MOI of 10 and invasion determined by a Gentamicin protection assay. Bars represent geometric means \pm standard error. ns, not statistically significant. (TIF)

Figure S6 Expression of TviA in *S. Typhimurium* 14028 Nal^R reduces T3SS-1-driven NF- κ B activation in epithelial cells.

HeLa 57A cells were infected with the *S. Typhimurium* 14028 Nal^R derivatives or treated with bacterial growth media (mock treatment). Luciferase activity determined 5 h after infection ($N = 4$). Bars represent geometric means \pm standard error. **, $P < 0.01$; (TIF)

Figure S7 Bacterial colonization in the mouse colitis model.

(A and B) Streptomycin-pretreated mice were infected with the indicated *S. Typhimurium* SL1344 derivatives as described in Figure 6. The bacterial load in the colon content (A) and the Peyer's patches (B) was determined 12 h after infection. Bars represent geometric means \pm standard error. ns, not statistically significant. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SEW MGW VP AMK TS FF TAP RLS AJB. Performed the experiments: SEW MGW VP AMK TS FF LCF FC EAC GESA TAP RLS. Analyzed the data: SEW MGW VP AMK TS FF LCF FC EAC GESA TAP RLS AJB. Wrote the paper: SEW RLS AJB.

References

- Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA (2009) Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe* 6: 10–21.
- Tukhvatulin AI, Gitlin II, Shcheblyakov DV, Artemicheva NM, Burdelya LG, et al. (2013) Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-kappaB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 81: 3855–3864.
- Glynn JR, Palmer SR (1992) Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a *Salmonella* outbreak. *Am J Epidemiol* 136: 1369–1377.
- Day DW, Mandal BK, Morson BC (1978) The rectal biopsy appearances in *Salmonella colitis*. *Histopathology* 2: 117–131.
- McGovern VJ, Slavutin LJ (1979) Pathology of salmonella colitis. *Am J Surg Pathol* 3: 483–490.
- Harris JC, Dupont HL, Hornick RB (1972) Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann Intern Med* 76: 697–703.
- Alvarado T (1983) Faecal leukocytes in patients with infectious diarrhoea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 316–320.
- Guyot J, Gonvers JJ, Pyndiah N, Heitz M (1984) [Value of fecal leukocyte studies in cases of acute diarrhea]. *Schweiz Med Wochenschr* 114: 634–636.
- Sprinz H, Gangarosa EJ, Williams M, Hornick RB, Woodward TE (1966) Histopathology of the upper small intestines in typhoid fever. Biopsy study of experimental disease in man. *Am J Dig Dis* 11: 615–624.
- Mukawi TJ (1978) Histopathological study of typhoid perforation of the small intestines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 9: 252–255.
- Nguyen QC, Everest P, Tran TK, House D, Murch S, et al. (2004) A clinical, microbiological, and pathological study of intestinal perforation associated with typhoid fever. *Clin Infect Dis* 39: 61–67.
- McCormick BA, Miller SI, Carnes D, Madara JL (1995) Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 63: 2302–2309.
- Raffatelli M, Chessa D, Wilson RP, Dusold R, Rubino S, et al. (2005) The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect Immun* 73: 3367–3374.
- Fu Y, Galan JE (1998) The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 27: 359–368.
- Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93: 815–826.
- Friebel A, Ilchmann H, Aepfelbacher M, Ehrbar K, Machleidt W, et al. (2001) SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* 276: 34035–34040.
- Zhou D, Chen LM, Hernandez L, Shears SB, Galan JE (2001) A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol* 39: 248–259.
- Patel JC, Galan JE (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *The Journal of cell biology* 175: 453–463.
- Frances CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S (1993) Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 364: 639–642.
- Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE (1997) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 159: 5550–5559.
- Keestra AM, Baumber AJ (2013) Detection of enteric pathogens by the nodosome. *Trends Immunol* 35: 123–130.
- Zhang S, Santos RL, Tsois RM, Stender S, Hardt W-D, et al. (2002) SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves infected with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect Immun* 70: 3843–3855.
- Santos RL, Tsois RM, Zhang S, Ficht TA, Baumber AJ, et al. (2001) *Salmonella*-induced cell death is not required for enteritis in calves. *Infect Immun* 69: 4610–4617.
- Tsois RM, Adams LG, Ficht TA, Baumber AJ (1999) Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun* 67: 4879–4885.
- Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, et al. (2004) Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 72: 795–809.
- Sekirov I, Gill N, Jogova M, Tam N, Robertson M, et al. (2010) *Salmonella* SPI-1-mediated neutrophil recruitment during enteric colitis is associated with reduction and alteration in intestinal microbiota. *Gut microbes* 1: 30–41.
- Elsinghorst EA, Baron LS, Kopecko DJ (1989) Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5173–5177.
- Raffatelli M, Sun YH, Wilson RP, Tran QT, Chessa D, et al. (2005) Host restriction of *Salmonella enterica* serotype Typhi is not caused by functional alteration of SipA, SopB, or SopD. *Infect Immun* 73: 7817–7826.
- Rodriguez MS, Thompson J, Hay RT, Dargemont C (1999) Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 274: 9108–9115.
- Keestra AM, Winter MG, Auberger JJ, Frassle SP, Xavier MN, et al. (2013) Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. *Nature* 496: 233–237.
- Bishop A, House D, Perkins T, Baker S, Kingsley RA, et al. (2008) Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion. *Microbiology* 154: 1914–1926.
- Weinstein DL, O'Neill BL, Hone DM, Metcalf ES (1998) Differential early interactions between *Salmonella enterica* serovar Typhi and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 66: 2310–2318.
- Mills SD, Finlay BB (1994) Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microb Pathog* 17: 409–423.
- Keestra AM, Winter MG, Klein-Douwel D, Xavier MN, Winter SE, et al. (2011) A *Salmonella* virulence factor activates the NOD1/NOD2 signaling pathway. *MBio* 2: e00266–11.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, et al. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413: 852–856.
- Baker S, Dougan G (2007) The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin Infect Dis* 45 Suppl 1: S29–33.
- Virlogeux I, Waxin H, Ecobichon C, Popoff MY (1995) Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology* 141 (Pt 12): 3039–3047.
- Raffatelli M, Santos RL, Chessa D, Wilson RP, Winter SE, et al. (2007) The capsule encoding the *viaB* locus reduces interleukin-17 expression and mucosal innate responses in the bovine intestinal mucosa during infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infect Immun* 75: 4342–4350.
- Jansen AM, Hall LJ, Clare S, Goulding D, Holt KE, et al. (2011) A *Salmonella* Typhimurium-Typhi genomic chimera: a model to study Vi polysaccharide capsule function in vivo. *PLoS Pathog* 7: e1002131.
- Wangdi T, Winter SE, Baumber AJ (2012) Typhoid fever: “you can’t hit what you can’t see”. *Gut Microbes* 3: 88–92.
- Haneda T, Winter SE, Butler BP, Wilson RP, Tukul C, et al. (2009) The capsule-encoding *viaB* locus reduces intestinal inflammation by a *Salmonella* pathogenicity island 1-independent mechanism. *Infect Immun* 77: 2932–2942.
- Winter SE, Winter MG, Thiennimitr P, Gerriets VA, Nuccio SP, et al. (2009) The TviA auxiliary protein renders the *Salmonella enterica* serotype Typhi RcsB regulon responsive to changes in osmolarity. *Mol Microbiol* 74: 175–193.
- Wallis TS, Wood M, Watson P, Paulin S, Jones M, et al. (1999) Sips, Sops, and SPIs but not stn influence *Salmonella* enteropathogenesis. *Adv Exp Med Biol* 473: 275–280.
- Arricau N, Hermant D, Waxin H, Ecobichon C, Duffey PS, et al. (1998) The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol Microbiol* 29: 835–850.
- Kutsukake K, Ohya Y, Iino T (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 172: 741–747.
- Frye J, Karlinsey JE, Felise HR, Marzolf B, Dowidar N, et al. (2006) Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 188: 2233–2243.
- Ohnishi K, Kutsukake K, Suzuki H, Iino T (1990) Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 221: 139–147.
- Lucas RL, Lostroh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL, et al. (2000) Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 182: 1872–1882.
- Kage H, Takaya A, Ohya M, Yamamoto T (2008) Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease. *J Bacteriol* 190: 2470–2478.
- Lin D, Rao CV, Schlauch JM (2008) The *Salmonella* SPI1 type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system. *J Bacteriol* 190: 87–97.
- Bajaj V, Hwang C, Lee CA (1995) *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Molecular microbiology* 18: 715–727.
- Lee CA, Jones BD, Falkow S (1992) Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1847–1851.
- Figueiredo JF, Lawhon SD, Gokulan K, Khare S, Raffatelli M, et al. (2009) *Salmonella enterica* Typhimurium SipA induces CXCL12-chemokine expression through p38MAPK and JUN pathways. *Microbes and infection/Institut Pasteur* 11: 302–310.
- Chen LM, Hobbie S, Galan JE (1996) Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* 274: 2115–2118.

55. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, et al. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81: 1137–1146.
56. Schlumberger MC, Friebel A, Buchwald G, Scheffzek K, Wittinghofer A, et al. (2003) Amino acids of the bacterial toxin SopE involved in G nucleotide exchange on Cdc42. *J Biol Chem* 278: 27149–27159.
57. Winter SE, Raffatellu M, Wilson RP, Russmann H, Baumlér AJ (2008) The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol* 10: 247–261.
58. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167: 1882–1885.
59. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, et al. (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 7: 576–582.
60. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, et al. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol* 7: 569–575.
61. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Rohde M, et al. (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 71: 2839–2858.
62. Bruno VM, Hannemann S, Lara-Tejero M, Flavell RA, Kleinstein SH, et al. (2009) *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS pathogens* 5: e1000538.
63. Winter SE, Winter MG, Godínez I, Yang H-J, Russmann H, et al. (2010) A Rapid Change in Virulence Gene Expression during the Transition from the Intestinal Lumen into Tissue Promotes Systemic Dissemination of *Salmonella*. *PLoS Pathogens* 6: e1001060.
64. Zhang S, Adams LG, Nunes J, Khare S, Tsolis RM, et al. (2003) Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. *Infect Immun* 71: 4795–4803.
65. Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Müller AJ, et al. (2005) The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 174: 1675–1685.
66. Kestra AM, Godínez I, Xavier MN, Winter MG, Winter SE, et al. (2011) Early MyD88-Dependent Induction of Interleukin-17A Expression during *Salmonella* Colitis. *Infection and immunity* 79: 3131–3140.
67. Wilson RP, Winter SE, Spees AM, Winter MG, Nishimori JH, et al. (2011) The Vi capsular polysaccharide prevents complement receptor 3-mediated clearance of *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infection and immunity* 79: 830–837.
68. Wilson RP, Raffatellu M, Chessa D, Winter SE, Tukel C, et al. (2008) The Vi capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cell Microbiol* 10: 876–890.
69. Lawes M, Maloy S (1995) MudSaI, a transposon with strong selectable and counterselectable markers: use for rapid mapping of chromosomal mutations in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 177: 1383–1387.
70. Schmieger H (1972) Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* 119: 75–88.
71. Winter SE, Thiennimitr P, Nuccio SP, Haneda T, Winter MG, et al. (2009) Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype typhimurium infection. *Infect Immun* 77: 1904–1916.
72. Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Thiennimitr P, Poon V, et al. (2013) Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science* 339: 708–711.
73. Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MR, Winter S, et al. (2003) Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun* 71: 629–640.
74. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ (1989) A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5054–5058.
75. Stojiljkovic I, Baumlér AJ, Heffron F (1995) Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*: nucleotide sequence, protein expression, and mutational analysis of the *cchA cchB eutE eutJ eutG eutH* gene cluster. *J Bacteriol* 177: 1357–1366.
76. Hoiseith SK, Stocker BA (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238–239.
77. Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, et al. (2010) Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467: 426–429.
78. Lopez CA, Winter SE, Rivera-Chavez F, Xavier MN, Poon V, et al. (2012) Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of *Salmonella* by nitrate respiration. *MBio* 3: pii: e00143-12.
79. Simon R, Priefer U, Puhler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria. *Bio-Technology* 1: 784–791.
80. Kinder SA, Badger JL, Bryant GO, Pepe JC, Miller VL (1993) Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from *Yersinia enterocolitica* serotype O8 and construction of a transformable R-M+ mutant. *Gene* 136: 271–275.
81. Kestra AM, de Zoete MR, Bouwman LI, van Putten JP (2010) Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *J Immunol* 185: 460–467.
82. Kingsley RA, Reissbrodt R, Rabsch W, Ketley JM, Tsolis RM, et al. (1999) Ferrioxamine-mediated Iron(III) utilization by *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1610–1618.
83. Isberg RR, Falkow S (1985) A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* 317: 262–264.
84. Kestra AM, de Zoete MR, van Aubel RA, van Putten JP (2007) The central leucine-rich repeat region of chicken TLR16 dictates unique ligand specificity and species-specific interaction with TLR2. *J Immunol* 178: 7110–7119.
85. Wang RF, Kushner SR (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100: 195–199.
86. Bohez L, Ducatelle R, Pasmans F, Botteldoorn N, Haesebrouck F, et al. (2006) *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the HilA regulatory protein. *Vet Microbiol* 116: 202–210.
87. Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, et al. (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* 14: 33–43.
88. Godínez I, Haneda T, Raffatellu M, George MD, Paixao TA, et al. (2008) T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infect Immun* 76: 2008–2017.

ANEXO D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 197/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Resposta antimicrobiana para Salmonela**", que tem como responsável(is) **Renato de Lima Santos**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **8/ 10/2008**.

Este certificado expira-se em **8/ 10/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 197/2008**, related to the project entitled "**Antimicrobial responses to Salmonella**", under the supervisors of **Renato de Lima Santos**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 8, 2008**.

This certificate expires in **October 8, 2013**.

Belo Horizonte, 13 de Outubro de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 386 / 2013, relativo ao projeto intitulado "MECANISMOS PATOGENICOS DA SALMONELLA ENTERICA SOROTIPO TYPHIMURIUM PARA SOBREVIVER À PRIVAÇÃO DE FERRO EM MODELO DE CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS", que tem como responsável Tatiane Alves da Paixão, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/03/2014. Este certificado espira-se em 11/03/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 386 / 2013, related to the Project entitled "PATHOGENIC MECANISMS OF SALMONELLA TYPHIMURIUM TO SURVIVE TO IRON DEPRIVATION IN MURINE MODEL PRE-TREATED WITH DSS.", under the supervision of Tatiane Alves da Paixão, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/03/2014. This certificates expires in 11/03/2019.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 11/03/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 254 / 2012, relativo ao projeto intitulado "MECANISMOS PATOGENICOS DA SALMONELLA TYPHIMURIUM PARA SOBREVIVER À PRIVAÇÃO DE FERRO EM MODELO MURINO PRÉ-TRATADO COM ESTREPTOMICINA", que tem como responsável Tatiane Alves da Paixão, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/04/2013. Este certificado espira-se em 11/04/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 254 / 2012, related to the Project entitled "PATHOGENIC MECANISMS OF SALMONELLA TYPHIMURIUM TO SURVIVE TO IRON DEPRIVATION IN MURINE MODEL PRE-TREATED WITH STREPTOMICIN", under the supervision of Tatiane Alves da Paixão, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/04/2013. This certificates expires in 11/04/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 11/04/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



ATA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO DA ALUNA

LUCIANA FACHINI DA COSTA

Realizou-se, no dia 30 de outubro de 2014, às 14:00 horas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Geral, UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a apresentação do exame de qualificação da aluna **LUCIANA FACHINI DA COSTA**, número de registro 2011716904, intitulado *Iron acquisition pathways and colonization of the inflamed intestine by Salmonella enterica Typhimurium*, perante a Comissão Examinadora composta pelos professores: Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari - Orientador (UFMG), Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (Universidade Federal de Minas Gerais). Terminada a apresentação, foi considerada:

aprovada () reprovada

e, para constar, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 30 de outubro de 2014.

Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari (Doutor)

Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (Doutora)



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA LUCIANA FACHINI DA COSTA

Realizou-se, no dia 13 de agosto de 2015, às 13:00 horas, UFMG, ICB, Bloco C3, Sala 241, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *ESTUDO DE MECANISMOS PATOGÊNICOS UTILIZADOS PELA SALMONELLA ENTERICA SOROTIPO TYPHIMURIUM E SALMONELLA ENTERICA SOROTIPO TYPHI NO INTESTINO DE MODELOS ANIMAIS DE INFECÇÃO*, apresentada por LUCIANA FACHINI DA COSTA, número de registro 2011716904, graduada no curso de MEDICINA VETERINARIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Renato de Lima Santos - Orientador (UFMG), Prof(a). Maria Aparecida Scatamburlo Moreira (UFV), Prof(a). Geraldo Márcio da Costa (UFLA), Prof(a). Elisabeth Neumann (UFMG), Prof(a). Juliana Pinto da Silva Mol (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 13 de agosto de 2015.

Prof(a). Renato de Lima Santos (Doutor)

Prof(a). Maria Aparecida Scatamburlo Moreira (Doutora)

Prof(a). Geraldo Márcio da Costa (Doutor)

Prof(a). Elisabeth Neumann (Doutora)

Prof(a). Juliana Pinto da Silva Mol (Doutora)


CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG