

**CAMILA PINHEIRO DO CARMO**

**MORFOLOGIA CELULAR, PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ATIVAÇÃO  
DE MACRÓFAGOS POR *Salmonella enterica* SOROVAR ENTERITIDIS NO  
ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL**

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO  
E  
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFV

**MORFOLOGIA CELULAR, PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E ATIVAÇÃO  
DE MACRÓFAGOS POR *Salmonella enterica* SOROVAR ENTERITIDIS NO  
ESTADO VIÁVEL NÃO CULTIVÁVEL**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 02 de março de 2012.

---

Maria Cristina Dantas Vanetti

---

Renata Aparecida Mendes

---

Denise Mara Soares Bazzolli  
(Coorientadora)

---

Míriam Teresinha dos Santos  
(Orientadora)

Aos meus pais e meu irmão  
A todos os meus amigos pelo companheirismo

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa.

Ao laboratório de Imunovirologia Molecular e Glicobiologia pela disponibilização do espaço e ao laboratório de Nanomoléculas em especial ao professor Sukarno Olavo Ferreira pela ajuda nas observações das amostras.

À professora e orientadora Míriam T. dos Santos, pela orientação, ajuda, atenção, amizade, confiança e disponibilidade ao longo do curso.

Aos coorientadores professor Sérgio Oliveira de Paula e, em especial, à professora Denise Mara Soares Bazzolli, pela grande ajuda e participação direta durante a execução deste trabalho.

Às professoras Maria Cristina Dantas Vanetti e Renata Aparecida Mendes, membros da banca, pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento do trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, que tanto contribuíram para a construção do meu conhecimento.

Aos meus queridos pais e irmão, pelo carinho, atenção e compreensão das minhas ausências.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, pela disposição e ajuda.

A todos os colegas de laboratório, pela ajuda, pela amizade e pelo excelente convívio.

À Monise pela enorme ajuda com a cultura de macrófagos.

Às minhas grandes amigas Gardênia, Claudinha e Lisiane, pela paciência, apoio, e grandes esclarecimentos no trabalho.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## Sumário

LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. Introdução .....	1
2. Revisão de literatura.....	3
3. Material e Métodos .....	12
3.1. Micro-organismo, condição de cultivo e manutenção.....	12
3.2. Isolamento do gene <i>ssaB</i> , caracterização e análise filogenética.....	12
3.3. Obtenção de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 963 no estado VNC.....	14
3.4. Ativação de macrófagos por <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 no estado VNC.....	15
3.4.2. Ensaio de produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por macrófagos.....	15
3.5. Análise fenotípica das células viáveis submetidas a diferentes estresses e no estado VNC .....	16
3.5.1. Obtenção de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 963 submetidas a diferentes condições de estresse .....	16
3.5.2. Análise do perfil de ácidos graxos totais .....	17
3.5.3. Observação da morfologia celular por microscopia de força atômica.....	18
4. Resultados .....	19
4.1. Caracterização e análise filogenética do gene <i>ssaB</i> de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis PT4 963.....	19
4.2. Ativação de macrófagos por <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 963 no estado VNC.....	23
4.3. Composição de ácidos graxos totais de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis PT4 963 submetida a estresses e no estado VNC.....	25
4.4. Alterações morfológicas de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC .....	28
5. Discussão .....	31
5.1. Características do gene <i>ssaB</i> e ativação de macrófagos em presença de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC.....	31
5.2. Composição de ácidos graxos totais de membrana de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC .....	34
5.3. Alterações morfológicas de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC .....	39
6. Conclusões e Perspectivas.....	41
7. Referências Bibliográficas .....	43

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Identidade de nucleotídeos correspondentes ao gene *ssaB* de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 com as sequências de outros sorovares de *Salmonella* depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).....19

**Tabela 2.** Porcentual dos ácidos graxos totais de membrana de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 submetida a estresse frio, osmótico, nutricional, aos três estresses combinados e em diferentes tempos de permanência no estado viável não cultivável.....24

**Tabela 3.** Dimensões celulares de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 na fase logarítmica e em diferentes tempos de permanência no estado viável não cultivável estimadas por meio de microscopia de força atômica .....28

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Região promotora do gene *ssaB* e local de interação da proteína ativadora IHF.....18
- Figura 2.** Relação filogenética entre proteínas SsaB de diferentes sorovares de *Salmonella* e bactérias relacionadas obtida pela Máxima Parcimônia (MP) usando a sequência de aminoácidos da proteína SsaB de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 e as obtidas *in silico* ..... 21
- Figura 3.** Fagocitose de células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 em crescimento exponencial e no estado viável não cultivável por macrófagos .....22
- Figura 4.** Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos peritoneais em presença de doses consideradas infecciosa e não infecciosa de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 em fase logarítmica de crescimento e no estado viável não cultivável .....23
- Figura 5.** Perfil de ácidos graxos em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 durante a entrada no estado viável não cultivável.....26

## RESUMO

CARMO, Camila Pinheiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Morfologia celular, perfil de ácidos graxos e ativação de macrófagos por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis no estado viável não cultivável.** Orientadora: Míriam Teresinha dos Santos. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzolli e Sérgio Oliveira de Paula.

O patógeno de origem alimentar, *Salmonella* spp. é capaz de entrar no estado viável não cultivável (VNC) em resposta a condições ambientais adversas. A presença de células VNC é um problema de saúde pública, uma vez que as células neste estado não são detectadas pelas metodologias tradicionais utilizadas de rotina em laboratórios, resultando em avaliação inadequada de alimentos contaminados com patógenos. Os objetivos desse trabalho foram caracterizar o gene *ssaB* do isolado *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis PT4, avaliar a ativação de macrófagos e as alterações do envelope celular por microscopia de força atômica e por meio do perfil de ácidos graxos desta estirpe no estado VNC. O gene *ssaB* apresentou alta identidade entre os demais sorovares avaliados e o produto do gene apresentou similaridade com outras espécies de bactérias patogênicas. Por análise filogenética da sequência de aminoácidos, foi possível observar que a estirpe em estudo ficou próxima a outros sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica*, incluindo linhagens do sorovar Enteritidis e distante de *S. enterica* subsp. *arizonae* e de outras espécies da família Enterobacteriaceae. Os macrófagos foram ativados em contato com células VNC de *Salmonella*, porém as células neste estado foram incapazes de impedir ou diminuir a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos como as células em fase logarítmica. As células de *Salmonella* Enteritidis no estado VNC apresentaram perfil de ácidos graxos diferente das células em condição ótima de crescimento e similar ao perfil de células submetidas ao estresse frio, porém o perfil das células VNC não apresentou alteração com o aumento do tempo de permanência nesta condição. *Samonella* Enteritidis no estado VNC apresentou redução nas dimensões celulares (área, volume, perímetro, comprimento e diâmetro) e transição da forma bacilar para a forma cocóide. Neste trabalho conclui-se que a morfologia celular e o perfil de ácidos graxos de *Salmonella* Enteritidis PT4 no estado VNC são diferentes dos de células na fase exponencial e nossos resultados sugerem que *Salmonella* Enteritidis no estado VNC apresenta uma menor virulência devido ao impedimento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos.

## ABSTRACT

CARMO, Camila Pinheiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Cell morphology, fatty acid profile and macrophages activation by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis viable nonculturable state.** Adviser: Míriam Teresinha dos Santos. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli e Sérgio Oliveira de Paula.

The foodborne pathogen *Salmonella* spp. is able to enter in the viable nonculturable state (VBNC) in response to adverse environmental conditions. The presence of VBNC cells is a public health problem, since the cells in this state are not detected by traditional methods used in laboratories, resulting in inadequate assessment of contaminated food with pathogens. The aims of this study were to feature the gene *ssaB* of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis PT4, to evaluate the macrophages activation and the changes in the cell envelope by atomic force microscopy and by the fatty acid profile of this strain in the VBNC state. The *ssaB* gene showed high identity among the others evaluated serovars and the gene product showed similarity with other species of pathogenic bacteria. By phylogenetic analysis of amino acid sequence we could observe that the strain was similar to other serovars of *S. enterica* subsp. *enterica*, including serovar Enteritidis strains and distinct from *S. enterica* subsp. *arizonae* and other species of the family Enterobacteriaceae. The macrophages were activated by contact with *Salmonella* VBNC cells, but the cells in this state were unable to prevent or reduce the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by macrophages as the log cells. The *Salmonella* Enteritidis VBNC cells were fatty acid profile different from the profile of the cells in optimal condition of growth and similar to the fatty acid profile of cells subjected to cold stress, but, the fatty acid profile of the VBNC cells not altered with the increase in time of permanence in this state. *Salmonella* Enteritidis VBNC state showed reduction in cell size (area, volume, perimeter, length and diameter) and transition from bacillary form to coccoid form. In conclusion, cellular morphology and the fatty acid profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 VBNC cells are different from cells in exponential phase and our results suggest that *Salmonella* Enteritidis in the VBNC state is lower virulent due to prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by macrophages.

## 1. Introdução

*Salmonella* é o principal agente etiológico causador de doenças de origem alimentar em humanos, tais como febre entérica e salmonelose não-tifóide. Dentre os mais de 2500 sorovares de *Salmonella*, todos patogênicos, destaca-se *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, devido ao aumento significativo de surtos causados por este sorovar em vários países, inclusive no Brasil, nos últimos anos.

No genoma de *Salmonella* encontram-se vários genes de patogenicidade, dos quais muitos estão localizados em ilhas genômicas denominadas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI). A ilha de patogenicidade-II (SPI-2) contém mais de 40 genes, que podem variar de um sorovar para outro, uma vez que na transferência horizontal, genes inteiros ou parte deles podem ser perdidos. Os genes da SPI-2 estão relacionados à sobrevivência intracelular em seus hospedeiros, dentre os quais se destacam os que codificam um sistema de secreção tipo III, que secreta proteínas translocadoras e efetoras. Uma dessas proteínas é a proteína efetora SsaB que possui grande importância para a patogênese, visto que impede a formação do fagolisossomo permitindo a sobrevivência no interior de macrófagos. Acredita-se que SsaB esteja presente em todos os sorovares de *Salmonella*, entretanto ainda não foi caracterizado na estirpe *Salmonella* Enteritidis PT4 963.

O patógeno *Salmonella* também é reconhecido por apresentar grande resistência a diversas condições de estresse, tais como condições ácidas, de baixa atividade de água, estresse oxidativo e a presença de substâncias inibidoras. *Salmonella* apresenta várias estratégias de sobrevivência a condições adversas, dentre delas a entrada no estado fisiológico denominado viável não cultivável (VNC). Nessa condição, as células encontram-se viáveis, metabolicamente ativas, porém não conseguem multiplicar em meios de cultura utilizados rotineiramente em laboratório. Visto que, células no estado VNC não são detectadas nas análises microbiológicas convencionais, os patógenos neste estado podem estar presentes em alimentos e ao entrarem em contato com fatores presentes no hospedeiro, podem ressuscitar, ou seja, reverter sua condição tornando-se cultiváveis e manter virulência, consistindo um problema de saúde pública importante.

Células no estado VNC apresentam alterações fisiológicas e morfológicas significativas. Dentre estas alterações, destacam-se as mudanças do envelope celular que resultam na redução do tamanho celular e na transição da forma bacilar para a forma cocóide. As observações das mudanças morfológicas vêm sendo realizadas comumente por microscopia eletrônica de varredura (SEM), todavia, o uso da microscopia de força atômica (AFM), mais recentemente tem se mostrado uma excelente ferramenta, uma vez que, permite maior resolução da superfície celular gerando imagens tridimensionais com riqueza de detalhes e envolve um procedimento de preparo de amostra mais simples semelhante àquele utilizado em microscopia óptica. Já as modificações fisiológicas como alteração da composição de ácidos graxos de células VNC são pouco estudadas, mas acredita-se que tais alterações sejam importantes para a manutenção da viabilidade das células não cultiváveis. Alterações no perfil de ácidos graxos de *Salmonella* em condições de estresse ácido, térmico e relacionadas à resposta cruzada já foram investigadas, porém não há relatos na literatura sobre o perfil de ácidos graxos de membrana em *Salmonella* durante a indução ao estado VNC e em relação ao tempo de permanência nesta condição e sua possível correlação com as alterações do envelope celular neste estado.

A caracterização de genes de virulência do isolado *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 é importante, visto que a transferência de genes de virulência em ilhas de patogenicidade é dinâmica, podendo estar ausentes em alguns sorovares, assim como avaliar a capacidade de células VNC de *Salmonella* de manter a virulência por meio da ativação macrófagos. Além disso, é de grande relevância investigar as alterações fenotípicas, morfológicas e fisiológicas, de *Salmonella* no estado VNC, para o melhor entendimento dessa estratégia de sobrevivência. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram caracterizar o gene *ssaB* do isolado *Salmonella* Enteritidis PT4 963, avaliar a ativação de macrófagos e as alterações do envelope celular por microscopia de força atômica e por meio do perfil de ácidos graxos desta estirpe no estado VNC.

## 2. Revisão de literatura

O gênero *Salmonella* é um membro típico da família Enterobacteriaceae constituído por bacilos Gram negativos pequenos, mesófilos e anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. A maioria das salmonelas é móvel, por meio de flagelos peritríquios. *Salmonella* spp. são amplamente distribuídas na natureza, tendo humanos e animais como seu reservatório principal (MASTROENI e MASKELL, 2006). O seu *habitat* mais frequente é o trato intestinal de animais como aves, suínos, humanos, répteis e, ocasionalmente, insetos. Embora seu *habitat* seja o trato intestinal, pode ser encontrado em outros sítios. Quando presente no intestino, *Salmonella* é excretada nas fezes e pode ser transportada por insetos e outros seres vivos para vários locais (JAY *et al.*, 2005).

Este gênero consiste de duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (REEVES *et al.*, 1989). A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. Atualmente, o gênero abriga mais de 2500 sorovares, todos patogênicos, sendo mais da metade destes pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica*, que representa pelo menos 99,5 % das estirpes de *Salmonella* isoladas (WHO, 2007).

*Salmonella* é o mais importante agente etiológico de doenças de origem alimentar dentre as bactérias Gram negativas (JAY *et al.*, 2005). As doenças causadas por *Salmonella* spp. separam-se em dois grupos, segundo a divisão proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O primeiro composto pela febre entérica, causada pelos sorovares *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi (A, B e C), ambos exclusivamente encontrados em humanos; enquanto o segundo grupo de doenças é composto pelas gastroenterites ou salmoneloses não-tifóides, causadas pelos demais sorovares, alguns restritos a animais e outros causadores de doenças tanto em humanos quanto em animais, sendo os agentes mais frequentemente veiculados por alimentos (ICMSF, 2000). A febre entérica é uma doença sistêmica grave, especialmente quando causada por *Salmonella* Typhi com taxa de mortalidade elevada caracterizada por diarreia prolongada acompanhada de febre alta, dores abdominais, dores de cabeça e prostração que se manifestam de 7 a 28 dias após a ingestão de alimentos contaminados. As salmoneloses não-tifóides apresentam gravidade variável podendo ser caracterizadas por diarreia branda acompanhada de

dores abdominais que podem evoluir até quadros severos e resultar em óbito. Estes sintomas aparecem de 8 a 72 horas após o contato com o patógeno (MASTROENI e MASKELL, 2006).

Dentre os diversos sorovares existentes de *S. enterica* subsp. *enterica*, o sorovar *Salmonella* Typhimurium é o mais frequentemente implicado em surtos de gastroenterites em humanos em países desenvolvidos (SCHLOSSER *et al.*, 2000). Todavia, nos últimos anos, tem sido observado aumento expressivo da prevalência nas infecções humanas causadas pelo sorovar *Salmonella* Enteritidis. Dados levantados pela Organização Mundial de Saúde indicam que, no período de 2000-2002, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis foi o sorovar mais comumente relatado em todo o mundo, respondendo por 65 % dos isolados (HERIKSTAD *et al.*, 2002; VELGE *et al.*, 2005; GALANIS *et al.*, 2006). No Brasil, um impressionante aumento na incidência desse sorovar também tem sido relatado (FUZIHARA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2002).

*Salmonella enterica* sorovar Enteritidis é de origem aviária sendo encontrada principalmente em ovos, em carne de frango e de outras aves. Surtos com *Salmonella* Enteritidis geralmente estão associados a ovos ou alimentos contendo ovos (ST. LOUIS *et al.*, 1988) e carnes de aves, porém podem também ser encontrados em carne suína (PATRICK *et al.*, 2004). Até o início dos anos de 1970, os sorovares Gallinarum e Pullorum adaptados a aves raramente, causavam doenças em humanos (BULLIS, 1997). Todavia, em virtude desses sorovares causarem febre entérica em aves provocavam grandes prejuízos para a produção aviária. Por isso, foi realizado um intenso programa de erradicação destes sorovares incluindo o abate de frangos soropositivos e a vacinação. A eliminação de *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum permitiu o aumento da prevalência de um sorovar não adaptado antígenicamente similar, *Salmonella* Enteritidis. Estudos epidemiológicos mostram que o número de casos de salmonelose causada pela sorovariedade Enteritidis em humanos é inversamente proporcional à prevalência de *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum em aves. Acredita-se que esse sorovar pode ter sido transmitido para as aves através de ratos que visitavam os galinheiros (BAUMLER *et al.*, 2000; COGAN e HUMPHREY, 2003). Nos últimos 20 anos, tem sido apontado como o sorovar relacionado a infecções em humanos mais prevalente, especialmente, o fagotipo 4 (PT4) superando *Salmonella* Typhimurium (COGAN e HUMPHREY, 2003).

A taxa de mortalidade média por salmoneloses não-tifóides é de 4,1 %, variando de 5,8 % durante o primeiro ano de vida, para 2 % entre um e 50 anos e de 15 % para pessoas com mais de 50 anos (JAY *et al.*, 2005). Considera-se que a dose infecciosa para que ocorra salmonelose seja de  $10^7$  a  $10^9$  células por grama de alimento, no entanto esta pode ser bastante variável dependendo da virulência do sorovar responsável pelo surto e da susceptibilidade do hospedeiro. Devido à importância de *Salmonella* como patógeno, a legislação brasileira estabelece como padrão a ausência deste patógeno em 25 gramas de produto, ou seja, a contaminação de alimentos com este patógeno, independentemente da carga microbiana presente, os torna impróprios para consumo (BRASIL, 2001).

*Salmonella* apresenta vários fatores de virulência relacionados à resistência a condições estressantes, à invasão da célula hospedeira e à patogênese intracelular, (SHEA *et al.*, 1996; HENSEL, 2004; CHIU *et al.*, 2005; VERNIKOS e PARKHILL, 2006; SAROJ *et al.*, 2008). O sequenciamento do genoma de *Salmonella* (THOMSON *et al.*, 2008) permitiu a caracterização e identificação de genes envolvidos na patogenicidade, revelando a presença de ilhas de patogenicidade (SPI), certamente adquiridas por transferência horizontal gênica. As ilhas de patogenicidade são definidas como cassetes de genes no cromossomo que codificam uma patogenicidade em particular estabelecendo uma interação com o hospedeiro, com conteúdo CG menor que o restante do cromossomo e são inseridos dentro de genes que codificam para tRNA (MARCUS *et al.*, 2000). Atualmente, há 12 ilhas de patogenicidade identificadas em *Salmonella* (LAHIRI *et al.*, 2010), as SPI-1 e SPI-2 são as mais estudadas e codificam sistemas de secreção tipo III (TTSS) que são requeridos, respectivamente, para a invasão e para a sobrevivência dentro de hospedeiros (MARCUS *et al.*, 2000). A expressão dos fatores de virulência presentes nas SPIs é altamente coordenada de forma espacial e temporal (HANSEN-WESTER e HENSEL, 2001).

A SPI-2 possui 25 kb e contém aproximadamente 40 genes que garantem sobrevivência intracelular em seus hospedeiros. Além do sistema de secreção tipo III, responsável pela secreção de proteínas translocadoras e efetoras, a SPI-2 apresenta genes que codificam um sistema de dois componentes que controla sua própria expressão e a expressão dessas moléculas efetoras (OCHMAN *et al.*, 1996; FASS e GROISMAN, 2009). Estudos com mutantes nos genes da SPI-2 mostram a atenuação da virulência, em modelos murinos de infecção sistêmica (SHEA *et al.*, 1996) e em

estudos *in vitro* a não sobrevivência no interior de células fagocíticas como macrófagos (HENSEL *et al.*, 1998). Os genes presentes na SPI2, tais como *ssa*, *ssr*, *ssc*, são expressos dentro de hospedeiros (FOLEY e LYNNE, 2007), garantindo resistência ao estresse oxidativo, a condições ácidas, à alta osmolaridade, aos baixos níveis de oxigênio e à limitação de nutrientes no ambiente intracelular.

O gene *ssaB* é o primeiro transcrito do operon *ssaBCDE* de grande importância para a sobrevivência intracelular, uma vez que codifica uma proteína efetora que inibe o tráfego intracelular impedindo a fusão do lisossomo e endossomos ao vacúolo contendo *Salmonella* (SCV) (COLLAZO *et al.*, 1997; UCHIYA *et al.*, 1999). Além disso, a proteína efetora SsaB, com o auxílio de outras proteínas, está envolvida na capacidade de sentir o pH do meio citoplasmático da célula hospedeira e no processo de sinalização da proteína Kinase (PKA), atuando na indução da expressão de interleucina 10 (IL-10), um inibidor de macrófagos ativados (UCHIYA *et al.*, 2004). Dessa forma SsaB possui um importante papel na sobrevivência e multiplicação intracelular de *Salmonella*.

Além das diversas características diretamente relacionadas à virulência, o gênero *Salmonella* é bastante conhecido por apresentar capacidade de resistir ou de se adaptar a várias condições ambientais adversas. Os micro-organismos são submetidos a diferentes intensidades de estresse, desde um estresse leve, onde a velocidade de crescimento é reduzida, e as células se adaptam completamente a nova condição, até o estresse letal em que as respostas podem levar à morte celular, passando pelo estresse extremo, onde o crescimento para e as células sacrificam suas fontes de reservas para sobreviver (YOUSEF e COURTNEY, 2003). Um estresse muito intenso pode levar à injúria que se caracteriza pelo decréscimo na resistência a agentes seletivos e pelo aumento no requerimento nutricional. Células injuriadas podem ser recuperadas facilmente utilizando-se meios de enriquecimento não seletivos como os empregados em análises microbiológicas para a detecção de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (MONTVILLE, 1997). As células submetidas a um estresse nutricional passam ao estado de inanição (*starvation*), o qual pode ser definido como o estado de resposta fisiológica diante da falta de nutriente. Neste estado, as células também apresentam um decréscimo drástico no seu metabolismo, mas conseguem ser cultivadas em meio de cultura com suprimentos nutricionais adequados, mesmo que em um período maior de tempo, isto é, apresentam aumento significativo da fase lag (OLIVER *et al.*, 1991). Dentre as

várias respostas a condições de estresse, tais como condições ácidas, de baixa atividade de água, estresse frio, estresse oxidativo e a presença de substâncias inibidoras, *Salmonella* pode entrar no estado fisiológico denominado viável não cultivável (VNC).

Bactérias não formadoras de esporos, como *Salmonella* podem adotar como estratégia de sobrevivência, quando expostas a condições ambientais adversas, o estado viável não cultivável ou VNC (OLIVER, 2005). A primeira evidência da existência do estado VNC em bactérias patogênicas foi indicada por Xu e colaboradores (1982), que mostraram que células de *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Vibrio cholerae* mantidas em água do mar artificial perdiam sua capacidade de formar colônia em meio de cultura, porém, permaneciam viáveis. Ou seja, as células microbianas estavam metabolicamente ativas, porém eram incapazes de crescer em meios de cultura rotineiramente utilizados em análises microbiológicas.

Na literatura são descritas mais de 60 espécies bacterianas patogênicas ou não que entram no estado VNC (OLIVER, 2010), dentre elas, bactérias gram-negativas como *Salmonella* (ROSZAK *et al.*, 1984; CARO *et al.*, 1999; ASAKURA *et al.*, 2002; REISSBRODT *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2003; OLIVER, 2005), *V. cholerae* (COLWELL *et al.*, 1985; SEELIGMANN *et al.*, 2008), *Vibrio vulnificus* (OLIVER *et al.*, 1991; SMITH e OLIVER, 2006), *Campylobacter* (ROLLINS e COLWELL, 1986) e *Escherichia coli* O157:H7 (MAKINO *et al.*, 2000; ASAKURA *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008) e em bactérias Gram positivas não formadoras de esporos como *Enterococcus faecalis* (LLEÒ *et al.*, 1998), *L. monocytogenes* (BESNARD *et al.*, 2000; DREUX *et al.*, 2007) e *Lactococcus lactis* (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2007).

A entrada no estado VNC pode ocorrer devido a diversos estresses ambientais. Dentre estes fatores de indução do estado VNC pode-se citar o aumento de temperatura para a bactéria psicrotrófica *Pseudomonas fluorescens* (OLIVER, 2000); a exposição a diferentes concentrações de sulfato de cobre para *Erwinia amylovora* (ORDAX *et al.*, 2006); *E. coli* linhagem ED8739 (GREY e STECK, 2001), *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium leguminosarum* (ALEXANDER *et al.*, 1999), *R. melioli* (MANAHAN *et al.*, 1997) e *Xanthomonas campestris* (GHEZZI e STECK, 1999) e a exposição a condições ácidas (ácido peracético) para

*Salmonella* Typhimurium (JOLIVET-GOUGEON *et al.*, 2006), *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (CHAVEERACH *et al.*, 2003).

Entretanto, a escassez de nutrientes, temperaturas baixas, estresse hiperosmótico e oxidativo têm sido indicados como os principais fatores de indução do estado VNC inclusive para *Salmonella* (MCDOUGALD *et al.*, 1998; Oliver, 2000; ASAKURA *et al.*, 2007). Em diferentes estudos, verifica-se que o tempo requerido para a transição para o estado VNC depende das condições de indução empregadas bem como da estirpe bacteriana. Por exemplo, a linhagem *S. enterica* Typhimurium DT 104 entra no estado VNC após 273 dias em solução tampão fosfato a 0,0735 mM mantida a 5°C (GUPTE *et al.*, 2003) enquanto, a entrada de estirpes de *S. enterica* Oraniemburg no estado VNC ocorreu após a incubação por apenas 24 horas em uma solução contendo 7 % de cloreto de sódio a 4°C (ASAKURA *et al.*, 2002). Foi detectada a presença de *S. enterica* Enteritidis no estado VNC em microcosmo de água de rio mantido por 48 horas em temperatura ambiente (ROSZAK *et al.*, 1984). Parte da população de *S. enterica* Enteritidis CCS3, isolada de suínos, entrou no estado VNC após 10 dias de inoculação em solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  adicionada de cloreto de sódio  $1,02 \text{ mol.L}^{-1}$  e mantida a 5°C (FLORESTA, 2006). Mendes (2009) verificou que o tempo de entrada de 100% da população no estado VNC incubada em tampão BPS adicionado de cloreto de sódio  $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$  e mantida a 4 °C variou de acordo com a estirpe, para *S. enterica* Enteritidis PT4 963 foi de 67 dias, para *S. enterica* Typhimurium ATCC 14028 foi de 40 dias e para *S. enterica* Enteritidis CCS3 foi de 120 dias.

Quanto à manutenção da virulência de células VNC, há controvérsia na literatura. Estudos mostram que patógenos no estado VNC mantêm virulência, como por exemplo, a presença de transcritos de genes de patogenicidade em *V. vulnificus* (SAUX *et al.*, 2002) em *Mycobacterium tuberculosis* (PAI, *et al.*, 2000) e em *E. coli* (GUNASEKERA *et al.*, 2002; YARON e MATTHEWS, 2002; LIU *et al.*, 2010a; LIU *et al.*, 2010b). Entretanto, em outros estudos, a retenção da virulência não foi mantida no estado VNC como em *Salmonella* Typhimurium (BALEUX *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 2002), *L. monocytogenes* (CAPPELIER *et al.*, 2005), *Vibrio parahaemolyticus* (COUTARD *et al.*, 2005) e *Vibrio harveyi* (SUN *et al.*, 2008). Em alguns estudos, a virulência somente foi observada em ensaios *in vivo* como em *Salmonella* Typhimurium (JOLIVERT-GOUGEON *et al.*, 2006), *E. coli* (POMMEPUY *et al.*, 1996), *Shigella dysenteriae* (RAHMAN *et al.*, 1996) e *Vibrio*

spp. (BAFFONE *et al.*, 2003), mostrando que em alguns casos a virulência é retomada após a passagem do patógeno em modelos animais. Por meio das técnicas de RT-PCR e qRT-PCR vários trabalhos demonstram a expressão gênica de diferentes fatores de virulência continuada em células no estado VNC. Por exemplo, maior expressão dos genes *stx1* e *stx2*, que codificam a proteína Shiga-like em *E. coli* O157:H7 no estado VNC em relação às células cultiváveis (LIU *et al.*, 2010b). Além disso, a presença de outros transcritos como dos genes *mobA*, *rfbE*, *sti1*, 16S rRNA (YARON e MATTHEWS, 2002) e *rpoS* (LIU *et al.*, 2010a) foi observada em *E. coli* O157:H7 no estado VNC. Em *V. vulnificus* no estado VNC, ocorre a expressão do gene *vvhA* que codifica uma hemolisina, considerada um fator de virulência importante (SMITH e OLIVER, 2006). Entretanto, o transcrito do gene *invA*, relacionado à invasão das células epiteliais não foi detectado em *Salmonella* Enteritidis no estado VNC por RT-PCR (MENDES, 2009). Deve-se, no entanto considerar que embora não tenha sido detectada a presença de um transcrito específico, a virulência pode ser mantida, pois tal capacidade é resultado de uma ação conjunta de vários genes.

Células no estado VNC apresentam alterações no seu metabolismo, como redução no transporte de nutrientes, na taxa de respiração e na síntese de macromoléculas (OLIVER, 2005). Entretanto, durante esse estado fisiológico, novas proteínas são sintetizadas (HEIM *et al.*, 2002), entre elas as proteínas do choque frio e as do estado de inanição (MORTON e OLIVER, 1994). A concentração de ATP intracelular permanece alto nesse estado, o que não ocorre em células mortas ou moribundas (FEDERIGHI *et al.*, 1998). Constatou-se que a expressão gênica nas células VNC de *E. faecalis* não cessa (LLEÒ *et al.*, 2000), podendo expressar um fenótipo diferente das células em fase log ou em estacionária de crescimento.

Além disso, células VNC apresentam mudanças morfológicas significativas como redução de tamanho (OLIVER, 2000; OLIVER, 2005), transição para forma cocóide (GUPTE *et al.*, 2003; ALBERTINI *et al.*, 2006) e alterações bioquímicas do envelope celular como modificação do peptídeoglicano (SIGNORETTO *et al.*, 2000; SIGNORETTO *et al.*, 2002). Redução de tamanho e mudança para a forma cocóide das células de *Edwardsiella tarda* foram observadas (DU *et al.*, 2007). A mesma mudança foi observada na morfologia de *V. cholerae* (CHAIYANAN *et al.*, 2001; CHAIYANAN *et al.*, 2007), de *Vibrio alginolyticus* (ALBERTINI *et al.*, 2006) e de *S. enterica* Typhimurium (GUPTE *et al.*, 2003). Essas mudanças morfológicas fazem

parte da estratégia de sobrevivência e são resultados da contração citoplasmática e da redução do volume periplasmático, pois visam minimizar as necessidades da célula por nutrientes neste estado (ABDALLAH *et al.*, 2007).

As alterações do envelope celular de bactérias no estado VNC vêm sendo avaliadas com o uso da microscopia eletrônica de varredura (SEM) (GUPTE *et al.*, 2003; FLORESTA, 2006; CHAIYANAN *et al.*, 2007; DU *et al.*, 2007), porém a técnica de SEM apresenta algumas limitações se comparada à microscopia de força atômica (AFM). A microscopia de força atômica é uma digitalização de campo inventada em 1986, para investigar a nanoscopia (BINNIG *et al.*, 1986) apresentando várias vantagens em relação às outras microscopias. As imagens são obtidas de diferentes ângulos a partir de amostras em meio líquido com alta resolução e alta magnificação, o que tornam essa metodologia mais vantajosa que a microscopia eletrônica de varredura (GOLDSTEIN *et al.*, 1992). Além disso, a AFM não somente promove uma imagem tridimensional (3D) verdadeira da superfície de amostras de bactérias em uma escala abaixo do micrometro, mas também dispensa condições de preparo a vácuo, coloração, ou camada de metal na superfície das amostras, tornando o preparo mais simples e rápido, além de manter a forma original da amostra que os preparos complexos das outras microscopias distorcem (LIU e WANG, 2010). Dessa forma, a utilização da microscopia de força atômica para a análise de superfícies de espécimes biológicos vem se destacando (AMRO *et al.*, 2000; BRAGA E RICCI, 2004; LIU e WANG, 2010).

A AFM foi empregada para avaliar a alteração morfológica de micro-organismos como *E. coli* após a exposição ao antimicrobiano cefodizima (BRAGA e RICCI, 1998) e em outros estudos relacionados a infecção de bacteriófagos em células microbianas (DUDROVIN *et al.*, 2008), além da observação do comportamento de micro-organismos como na dinâmica de formação de biofilmes (YUAN e PEHKONEM, 2009). Para estudo do estado VNC, Abdallah e colaboradores (2007) observaram as mudanças da morfologia celular por AFM de *Salmonella bovismorphicans* presente no solo por 13 anos e após a recuperação de sua culturabilidade.

Além de alterações na morfologia das células no estado VNC, vários trabalhos têm sido conduzidos para o estudo de alterações na composição química dos constituintes do envelope de células no estado VNC (SIGNORETTO *et al.*, 2000; SIGNORETTO *et al.*, 2002; ASAKURA *et al.*, 2007). Modificações na

composição dos ácidos graxos da membrana citoplasmática também têm sido constatadas em células de *V. vulnificus* no estado VNC e parecem ser essenciais para garantir a manutenção da viabilidade neste estado (OLIVER, 2000; DAY e OLIVER, 2004). Mudanças no peptídeoglicano, tais como o aumento das ligações cruzadas, diminuição da cadeia de açúcares, aumento de muropeptídeos ligados a lipoproteínas, diminuição de tetrapeptídeos, aumento de tripeptídeos e presença de muropeptídeos anidros também foram observadas em *Enterococcus faecalis* (SIGNORETTO *et al.*, 2000) e em *E. coli* KN126 (SIGNORETTO *et al.*, 2002). Em *E. coli* O157:H7 no estado VNC foi constatada a redução significativa da quantidade de proteínas hidrofóbicas na membrana externa (ASAKURA *et al.*, 2007).

Patógenos no estado viável não cultivável podem ser responsáveis por surtos de infecções alimentares. No Japão, sugere-se que um surto causado por *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 no estado VNC tenha ocorrido envolvendo em um alimento tradicional a base de salmão preparado com elevada concentração de sal (MAKINO *et al.*, 2000). A indução do estado VNC em patógenos como *Salmonella* expostos a condições de estresse durante o processamento tem causado grande preocupação aos órgãos de saúde pública (ROWAN, 2004). Esses patógenos no estado VNC, por serem capazes de se manter viáveis, mas não cultiváveis por um período longo de tempo, não serem detectados pelos métodos convencionais de análise de alimentos, poderem ressuscitar (retomar a culturabilidade, especialmente *in vivo*) e manterem virulência, aumentam o risco potencial de infecções causadas por alimentos tidos como adequados para o consumo (OLIVER, 2010).

### **3. Material e Métodos**

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Patógenos Alimentares e Genética Molecular de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia e no laboratório de Imunovirologia Molecular e Glicobiologia do Departamento de Biologia Geral e as análises de microscopia de força atômica foram realizadas no laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

#### **3.1. Micro-organismo, condição de cultivo e manutenção**

A estirpe *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 utilizada neste trabalho pertence ao acervo do Laboratório de Patógenos Alimentares e foi gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) tendo sido isolada de amostras de peito de frango envolvidas em um surto alimentar. A estirpe foi mantida estocada em caldo Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI) acrescido de 20 % de glicerol a -80 °C. Anteriormente à realização de cada experimento, a cultura estoque foi ativada por duas vezes em 10 mL de caldo BHI a 37 °C por 12 horas. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 2723 g por 20 minutos e ressuspensa em 10 mL de solução salina 0,85 %. Dessa suspensão bacteriana, foi retirada alíquota de 100 µL e transferida para 10 mL de caldo BHI. A cultura foi mantida a 37 °C por aproximadamente 2,5 horas, até apresentar uma densidade óptica (D.O.<sub>600nm</sub>) de 0,3, referente à fase exponencial de crescimento, que corresponde a uma população de aproximadamente 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL<sup>-1</sup>). Suspensão de células na fase logarítmica foi utilizada como controle em todos os experimentos e a partir desta foram realizados os tratamentos para a obtenção das células submetidas às diferentes condições de estresse e para a indução do estado VNC.

#### **3.2. Isolamento do gene *ssaB*, caracterização e análise filogenética**

Para o isolamento e posterior caracterização do gene *ssaB* o DNA genômico de *Salmonella* Enteritidis foi obtido utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA

*Purification*, de acordo com as instruções do fabricante. A presença do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8 % e a concentração foi checada em gel de agarose 0,8 % utilizando marcadores de quantidade de DNA de fago  $\lambda$  na concentração de 25 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ , 50 ng. $\mu\text{L}^{-1}$  e 100 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ . O DNA genômico foi usado como molde na reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando *primers* específicos desenhado a partir do genoma da linhagem *Salmonella* Enteritidis P12 5109 (Thompson *et al.*, 2008) depositado no banco do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para o gene *ssaB*, *Forward* - *FssaB* (5' - TCGCCTGTGACAAGGTATATGTAG - 3') e *Reverse* - *RssaB* (5' - GGGTGAAGTCATTACCTTTCCA - 3'). As misturas das reações de PCR foram feitas para um volume final de 25  $\mu\text{L}$  e continham aproximadamente 20 ng de DNA molde, tampão 10X (PROMEGA TM, Madison, EUA), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada *primer*, 200  $\mu\text{M}$  de desoxinucleotídeos (dNTP's) e 0,02 U de Taq DNA polimerase (PROMEGA TM, Madison, EUA).

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Master Gradient*, *Eppendorf* - Germany), programado para realizar a desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 1 minuto, extensão por 1 minuto a 72 °C e extensão final durante 15 minutos a 72 °C. Os produtos resultantes da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1,5 % m/v) e a quantificação foi realizada com marcadores de quantidade de DNA fago  $\lambda$  nas concentrações de 25 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ , 50 ng. $\mu\text{L}^{-1}$  e 100 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ . Após a quantificação, os produtos de PCR foram purificados com o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) e o produto purificado foi submetido a reação de sequenciamento utilizando-se o kit *DYEnamic TM ET dye terminator* (MegaBACE TM, GE Healthcare) juntamente com os *primers* *FssaB* e *RssaB* (individualmente). Por fim, as amostras foram processadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics), seguindo-se as recomendações do fabricante. As identidades das sequências nucleotídicas foram comparadas àquelas armazenadas no banco de dados do NCBI. Além disso, a sequência nucleotídica do gene *ssaB* foi traduzida pelo programa Blastx e comparada àquelas armazenadas no banco de dados de proteínas do NCBI.

O alinhamento manual das sequências de aminoácidos referentes à sequência do gene *ssaB* traduzida, e das sequências referenciais dos sorovares de *Salmonella* e das outras espécies retiradas do banco de dados foi realizado no programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008). A árvore filogenética foi construída

utilizando Máxima Parcimônia (MP). A árvore filogenética foi inferida por meio do programa Paup 4b10 (Swofford *et al.*, 2001). A árvore de MP foi encontrada através de uma busca heurística, inicializando com a adição das sequências pelo modo *stepwise*. O algoritmo de bissecação e reconexão de árvore (TBR) foi também utilizado para aperfeiçoar esta árvore. O teste não-paramétrico ou *bootstrap* (Felsenstein, 1985; Efron *et al.*, 1996) com 5000 replicações foi utilizado para estimar a robustez de cada ramo interno da árvore, uma vez que oferece suporte estatístico indicando a confiabilidade dos dados da análise filogenética.

### **3.3. Obtenção de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 no estado VNC**

As células de *Salmonella* Enteritidis no estado VNC foram preparadas conforme metodologia descrita por Mendes (2009). Para a obtenção de células no estado VNC, três mL da suspensão de células em fase logarítmica ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) foram inoculados em frasco contendo 300 mL de solução fosfato de Butterfield (BPS) preparada de acordo com a AOAC (1998), contendo 7,35 mmol.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> acrescida de 1,2 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio. A população inicial foi padronizada em aproximadamente  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e os frascos foram colocados em geladeira a 4 °C por aproximadamente, 70 dias.

Para verificar a perda da culturabilidade de *S. Enteritidis* no estado VNC após 70 dias, foi utilizada uma alíquota de 10 mL da amostra original em 10 mL de meio BHI com concentração dupla e mantida a 37 °C por 48 horas, com a finalidade de verificar crescimento por meio da turvação do meio. A viabilidade celular foi estimada por contagem de células viáveis a partir de alíquotas retiradas do meio BPS após perda de 100 % da culturabilidade utilizando o kit Live/Dead<sup>®</sup>*BacLight* (Molecular Probes), segundo as instruções do fabricante. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 50 e para cada amostra, quinze campos de duas lâminas foram contados, conforme descrito por Mendes (2009).

### **3.4. Ativação de macrófagos por *Salmonella* Enteritidis PT4 no estado VNC**

#### **3.4.1. Análise da ativação de macrófagos por microscopia**

A capacidade de reconhecimento de *Salmonella* Enteritidis e posterior fagocitose por macrófagos foram avaliadas pelo uso de macrófagos extraídos de camundongos da raça BALB/C. As células (macrófagos) extraídas foram cultivadas em meio *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino, além de 1 % dos antibióticos fungizona, penicilina e estreptomicina.

A metodologia utilizada para o ensaio de sobrevivência no interior de macrófagos foi a descrita por Humphreys e colaboradores (1999), com modificações. Os macrófagos peritoneais foram semeados em lamínulas estéreis presentes dentro de poços de placas de culturas de tecidos de seis poços. Foram coletados aproximadamente  $2 \times 10^6$  de macrófagos peritoneais em 300  $\mu\text{L}$  de alíquota, após isso, as placas foram incubadas por aproximadamente 1 hora a 37 °C com 5 % de  $\text{CO}_2$ . Antes da infecção, as monocamadas formadas foram lavadas duas vezes em DMEM sem antibiótico. Na tentativa de verificar diferenças na fagocitose em relação à carga microbiana, foi utilizada uma densidade celular aceita como dose infecciosa de *Salmonella* ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e uma carga microbiana considerada não infecciosa ( $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>) das suspensões de *Salmonella* em fase logarítmica e no estado VNC. Estas foram ressuspendidas em meio DMEM e 300  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram adicionados para cada poço. Após as células terem sido colocadas nos poços, as placas foram incubadas por 2 horas e as lamínulas foram lavadas 2 vezes com PBS estéril e deixadas em paraformaldeído 10 % por 12 horas. As lamínulas foram retiradas e fixadas com metanol 100 % e coradas em solução de eosina e solução de cristal violeta, após terem sido secadas, as lamínulas foram observadas em microscópio óptico (Olympus BX 50).

#### **3.4.2. Ensaio de produção de $\text{H}_2\text{O}_2$ por macrófagos**

Para avaliar a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por macrófagos peritoneais, inicialmente estes foram extraídos de camundongos da raça BALB/C e contadas em câmara de

Newbauer. A concentração da suspensão de macrófagos foi acertada para  $2 \times 10^6$  células por mL em solução PBS-dextrose (10 mM tampão fosfato de potássio, 140 mM NaCl, 5,5 mM dextrose, pH 7,0, 0,56 mM vermelho de fenol e  $0.01 \text{ mg.mL}^{-1}$  de peroxidase tipo II) e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de células foram transferidas para microplacas de 96 poços. Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  contendo  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (dose infecciosa) e  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> (dose não infecciosa) da suspensão de *Salmonella* Enteritidis PT4 na fase logarítmica e no estado VNC em triplicata. Como controle positivo, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de zimozam na concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em triplicata em poços contendo macrófagos e como controle negativo, em três poços contendo macrófagos foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução PBS-dextrose. A placa montada foi incubada por 60 minutos em estufa a 37 °C, em atmosfera constante de CO<sub>2</sub> 5 %. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com adição de 10  $\mu\text{L}$  em cada poço de NaOH 1 M e a leitura foi realizada pelo leitor PowerWave XS (BioTek) a 620 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão vermelho de fenol.

### **3.5. Análise fenotípica das células viáveis submetidas a diferentes estresses e no estado VNC**

#### **3.5.1. Obtenção de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 submetidas a diferentes condições de estresse**

Células de *Salmonella* Enteritidis foram submetidas a diferentes condições referentes ao estresse osmótico, nutricional, frio e à combinação desses três estresses como descrito a seguir: Primeiramente as células foram cultivadas até a fase logarítmica como descrito no item 3.1. A seguir, foram centrifugadas a 2723 g por 20 minutos e ressuspensas em 10 mL de solução salina 0,85 %, procedimento que foi repetido por mais duas vezes. Após as lavagens, a suspensão de células foi concentrada 10 vezes para a padronização do inóculo em aproximadamente  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Para a obtenção das células submetidas ao estresse osmótico foi inoculado 1 mL da suspensão padronizada em um frasco contendo 300 mL de caldo

BHI acrescido de  $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$  de cloreto de sódio, o qual foi incubado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por cinco dias. As células submetidas ao estresse nutricional foram obtidas a partir da inoculação de 1 mL da suspensão padronizada de células em um frasco contendo 300 mL de solução fosfato de Butterfield (BPS) preparada de acordo com a AOAC (1998), contendo  $7,35 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por cinco dias. Para as células submetidas ao estresse frio, uma alíquota de 1 mL da suspensão padronizada foi inoculada em um frasco contendo 300 mL de caldo BHI o qual foi incubado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por cinco dias. Para obtenção das células submetidas aos três estresses combinados, 1 mL da suspensão padronizada em  $10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$  foi inoculado em um frasco contendo 300 mL de solução BPS, acrescida de  $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$  de cloreto de sódio. Os frascos foram colocados em geladeira a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e mantidos por até 45 dias.

### **3.5.2. Análise do perfil de ácidos graxos totais**

A análise do perfil de ácidos graxos foi executada a partir de 300 mL das suspensões de células de *S. Enteritidis* PT4 963 na fase logarítmica, submetidas ao estresse frio, osmótico, nutricional e à combinação dos três estresses e a partir de 600 mL da suspensão de células no estado VNC em diferentes tempos de permanência na condição. As suspensões foram centrifugadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos a  $7444 \text{ g}$  para a obtenção do sedimento de células e estas, posteriormente lavadas com 1 mL de solução salina 0,85 % por três vezes.

Para o preparo das amostras a serem analisadas, são requeridos quatro reagentes para clivar os ácidos graxos dos lipídeos. O reagente 1 (45 g de hidróxido de sódio, 150 mL de metanol e 150 mL de água destilada) para a saponificação; o reagente 2 (325 mL de ácido clorídrico 6,0 N e 275 mL de álcool metílico) para a metilação; o reagente 3 (200 mL de hexano e 200 mL de metil tert-butil éter) para a extração; e o reagente 4 (10,8 g de hidróxido de sódio dissolvido em 900 mL de água destilada) para a limpeza da amostra. Os sedimentos de células utilizados para o reconhecimento dos perfis de ácidos graxos foram colocados em um tubo adicionado de 1 mL do reagente 1 e aquecidos em água de fervura por 30 minutos, posteriormente 2 mL do segundo reagente foi adicionado e a mistura foi homogeneizada em vortex e aquecida por 10 minutos a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para a extração dos

lipídeos, foi adicionado 1,25 mL do reagente 3 seguido de uma leve homogeneização por 10 minutos a temperatura ambiente, nesse momento observa-se a separação de fases onde a fase de baixo foi descartada. Os resíduos de lipídeos foram imediatamente tratados pelo reagente 4, adicionando-se 3 mL do mesmo, seguido de agitação por 5 minutos e 2/3 do conteúdo foi transferido para um tubo GC (cromatografia gasosa) para a análise propriamente dita.

Os perfis de ácidos graxos foram determinados pelo sistema SIM<sup>TM</sup> (*Scientific Instruments Manufacturer GmbH*) a partir da biblioteca padrão e o software MIDI Sherlock<sup>®</sup> (*Microbial Identification by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters (GC-FAME) Inc. Newark, Delaware, USA*). Os ácidos graxos foram separados em razão dos diferentes tempos de retenção, utilizando ar sintético, gás hidrogênio como carreador e gás nitrogênio como gás de compensação. Os resultados foram expressos como porcentagens relativas de cada ácido graxo, calculadas como a razão da área de superfície do pico considerado pela área total de todos os picos.

### **3.5.3. Observação da morfologia celular por microscopia de força atômica**

Com o objetivo de identificar possíveis modificações nas superfícies celulares, células na fase logarítmica e no estado VNC, com diferentes tempos de permanência nesta condição, foram observadas por microscopia de força atômica. As preparações microscópicas foram feitas com células na fase logarítmica obtidas a partir de cultura de *Salmonella* Enteritidis PT4 após ter atingido a D.O. desejada (0,3 para a fase logarítmica) e com células VNC que permaneceram por 15, 60, 90 e 300 dias após estarem 100 % neste estado, mantidas em tampão BPS adicionado de 1,2 mol.L<sup>-1</sup> de NaCl. As células com diferentes períodos de permanência VNC foram concentradas a partir de uma alíquota de 150 mL por centrifugação a 2723 g por 15 minutos. As suspensões de células log e VNC foram ressuspensas em 500 µL, transferidas para tubos de microcentrífuga juntamente com 1 mL de tampão fosfato (pH 6,5) e centrifugadas a 7166 g por 15 minutos. Esta etapa foi repetida por mais quatro vezes. Na última lavagem, o sedimento foi ressuspensado em 50 µL de tampão fosfato (pH 6,5) e com uma ponteira estéril foram feitos esfregaços de 1 cm<sup>2</sup> em uma lâmina de vidro de microscopia e deixados secar dentro da capela de fluxo laminar por 1 hora.

As dimensões celulares, volume, área, perímetro, comprimento e diâmetro, foram estimadas a partir das imagens obtidas no microscópio de força atômica NT-MDT, utilizando o modo de contato intermitente, no qual a ponta da agulha do microscópio fica em contato intermitente com a superfície da amostra a ser analisada, o que aumenta o poder de resolução da técnica e revela imagens detalhadas da superfície celular. As análises de AFM foram realizadas no Laboratório de Nanoscopia do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa.

## **4. Resultados**

### **4.1. Caracterização e análise filogenética do gene *ssaB* de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963**

Para investigar a presença do gene *ssaB*, também conhecido como *spiC*, o mesmo *ssaB* foi isolado e caracterizado. A sequência de nucleotídeos que corresponde ao gene *ssaB* completo (508 pb) apresentou polimorfismos em relação ao referido gene em outros sorovares. Este gene é o primeiro transcrito de um operon presente na ilha de patogenicidade II (SPI-2), apresenta uma região promotora que regula vários outros genes relacionados a virulência. O promotor possui *cis* elementos típicos reconhecidos pelo fator sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ), -10 e -35 e um possível *cis* elemento de reconhecimento e ligação da proteína IHF (*Integration Host Factor*) na posição 52, sobrepondo a região -10 do promotor que fica na posição 51. O promotor (Figura 1) possui dois nucleotídeos conservados na região -35 e cinco nucleotídeos conservados na região -10. Os genes são provavelmente regulados positivamente por um fator de integração denominado IHF, que se liga na região - 10 do promotor.

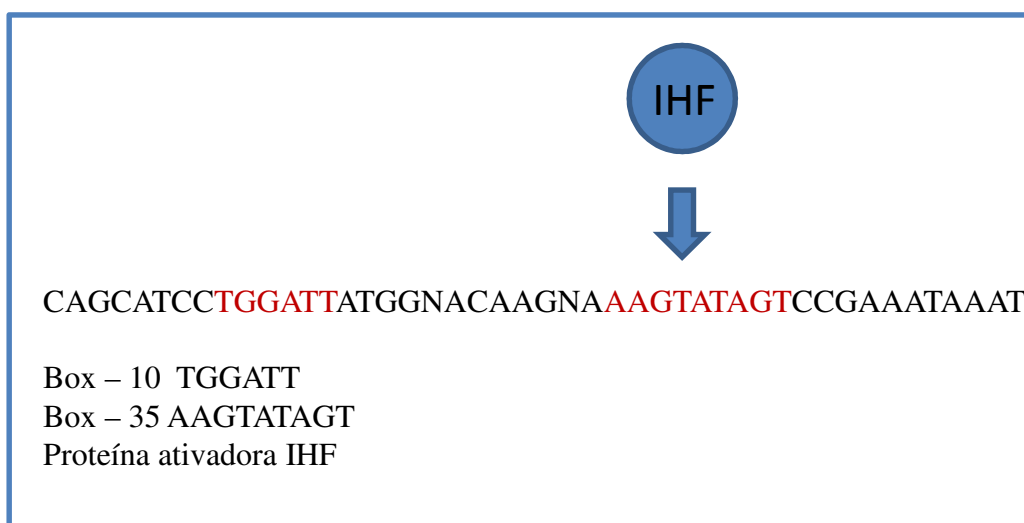


Figura 1. Região promotora do gene *ssaB* e local de interação da proteína ativadora IHF.

A proteína SsaB apresenta 40 kDa, a partir da dedução da sequência nucleotídica. Estes resultados são similares as outras proteínas SsaB presentes nos outros sorovares de *Salmonella* já estudados. A sequência do gene *ssaB* e do seu respectivo produto foram submetidos ao programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997), NCBI. Foram encontrados valores de cobertura entre 97% e 98% e de identidades entre 93 % e 98 % (Tabela 1). Os valores apresentados mostraram uma alta identidade entre as sequências do gene *ssaB*, isto é, há pouca variação entre os nucleotídeos das sequências contrastadas. Outro parâmetro utilizado nas análises foi o *E-value* (*Expected Value*), que confere maior confiabilidade às consultas à medida que o resultado se aproxima do zero. Este valor corresponde à probabilidade de se obter outro alinhamento com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de bases (Kerfeld e Scott, 2011).

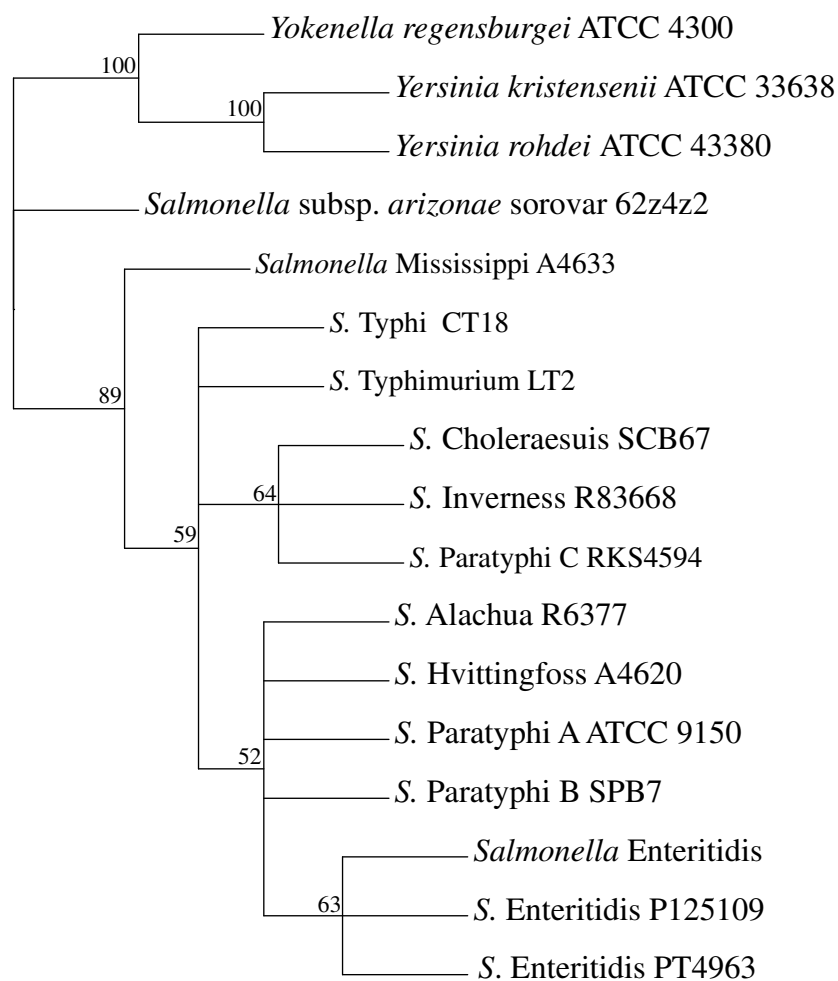
Tabela 1. Identidade de nucleotídeos correspondentes ao gene *ssaB* de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 com as sequências de outros sorovares de *Salmonella* depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Linhagens de <i>Salmonella</i>	Cobertura	<i>E-value</i>	Identidade
<i>Salmonella</i> Enteritidis P125109	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Gallinarum SG 9R	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Gallinarum 287/91	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium UK-1	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium ST4/74	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium SL1344	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium 14028S	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Typhimurium LT2	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Paratyphi A AKU_12601	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Paratyphi A ATCC 9150	98 %	0,0	94 %
<i>Salmonella</i> Weltevreden 2007-60-3289-1	98 %	0,0	93 %
<i>Salmonella</i> Typhi Ty2	98 %	0,0	93 %
<i>Salmonella</i> Typhi CT18	98 %	0,0	93 %
<i>Salmonella</i> Choleraesuis SC-B67	97 %	0,0	93 %
<i>Salmonella</i> Paratyphi C RKS4594	97 %	0,0	93 %

A identidade de nucleotídeos entre as sequências dos sorovares de *Salmonella* foi alta, e nas análises realizadas pelos algoritmos BLAST, não foi encontrada identidade com as sequências de genes relacionados em outras espécies, mesmo da família Enterobacteriaceae. No entanto, quando as análises foram feitas utilizando a sequência de aminoácidos, foi encontrada similaridade com proteínas de outras espécies, além das encontradas anteriormente. A partir destas análises uma análise filogenética com a sequência de aminoácidos da proteína SsaB foi realizada.

A análise filogenética da sequência de aminoácidos da proteína SsaB (Figura 2) mostrou que *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis encontra-se agrupada com outras linhagens do mesmo sorovar, a partir das análises realizadas no programa BLASTn. Outros sorovares como Typhimurium, Typhi, Paratyphi, Hvittingfoss, Alachua, Mississippi, Choleraesuis e Inverness, encontraram-se próximos ao sorovar Enteritidis formando um ramo. *Salmonella enterica* subespécie

*arizonae* foi dentre as *Salmonella* a que mais se distanciou filogeneticamente agrupando separadamente *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Apesar da proximidade indicada pela árvore, é possível observar que a proteína SsaB não é conservada entre os sorovares de *Salmonella*, pois apresenta similaridade com proteínas de outras espécies como a proteína efetora de *Yersinia*. Os gêneros *Yokonella* e *Yersinia* agruparam separadamente ao gênero *Salmonella* e entre àquelas, *Yokonella regensburgei* agrupou separadamente às espécies *Yersinia rohdei* e *Yersinia kristensenii*.



10

Figura 2. Relação filogenética entre proteínas SsaB de diferentes sorovares de *Salmonella* e bactérias relacionadas obtida pela Máxima Parcimônia (MP) usando a sequência de aminoácidos da proteína SsaB de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 e as obtidas *in silico*.

#### 4.2. Ativação de macrófagos por *Salmonella* Enteritidis PT4 963 no estado VNC

Para avaliar se macrófagos são ativados na presença de *Salmonella* Enteritidis no estado VNC, ensaio de produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais e observações microscópicas foram realizados. Nestes experimentos foram utilizados duas densidades celulares, uma carga microbiana aceita como dose infecciosa de *Salmonella* ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e uma densidade celular considerada não infecciosa ( $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>) de células no estado VNC e células na fase logarítmica, como controle.

A Figura 3 mostra que os macrófagos peritoneais fagocitaram as células em crescimento exponencial (Figuras 3A e 3C), porém não foi possível observar fagocitose das células no estado VNC independente da densidade celular utilizada (Figuras 3B e 3D).

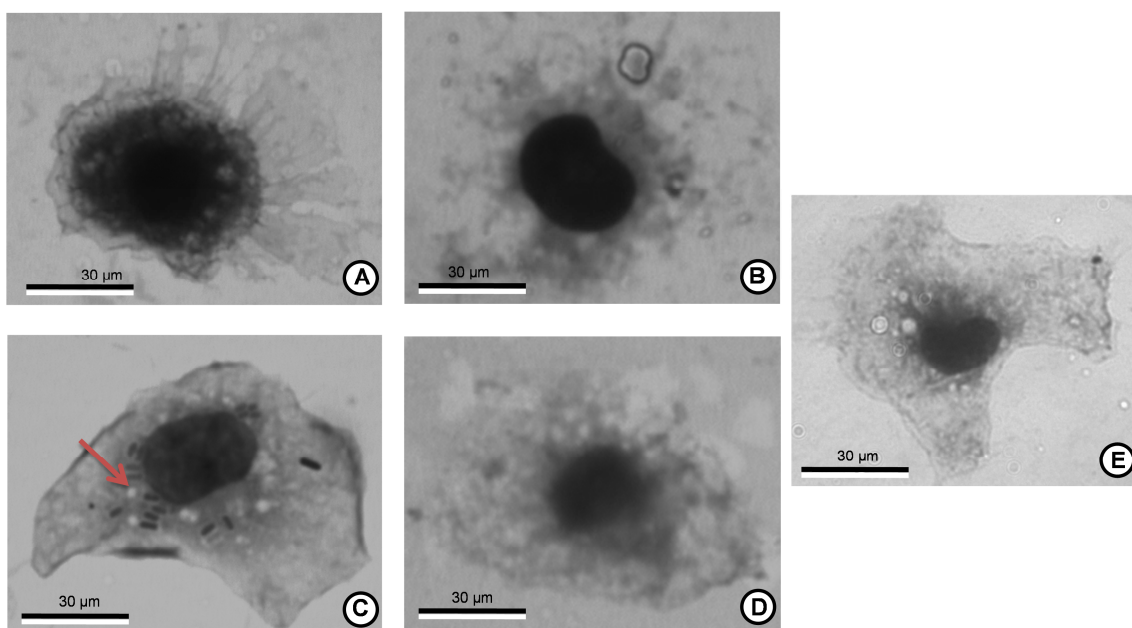


Figura 3. Fagocitose de células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 em crescimento exponencial e no estado viável não cultivável por macrófagos.

Macrófagos expostos à densidade populacional de  $10^4$  células de *Salmonella* na fase exponencial (A) e no estado VNC (B); Macrófagos expostos à densidade populacional de  $10^7$  células de *Salmonella* na fase exponencial (C) e no estado VNC (D); Macrófagos não expostos a células de *Salmonella* - controle negativo (E). Imagens obtidas em microscopia óptica em aumento de 1000X. A monocamada de macrófagos exposta a células de *Salmonella* foi incubada por 2 horas a 37°C em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Seta indica célula de *Salmonella* fagocitada.

O ensaio de produção de  $H_2O_2$  confirma a ativação dos macrófagos expostos à dose infecciosa de células de *Salmonella*, porém a quantidade de  $H_2O_2$  produzida é diferente entre as células em fase logarítmica e no estado VNC (Figura 4). Observou-se maior produção de  $H_2O_2$  pelos macrófagos na presença de células no estado VNC ( $5,62 \mu\text{mol}$  de  $H_2O_2$ ) que na presença de macrófagos inoculados com células em fase exponencial de crescimento ( $2,18 \mu\text{mol}$  de  $H_2O_2$ ). Porém, na densidade celular não infecciosa de *Salmonella* tanto na fase exponencial como no estado VNC não foi detectada produção de  $H_2O_2$  por macrófagos.

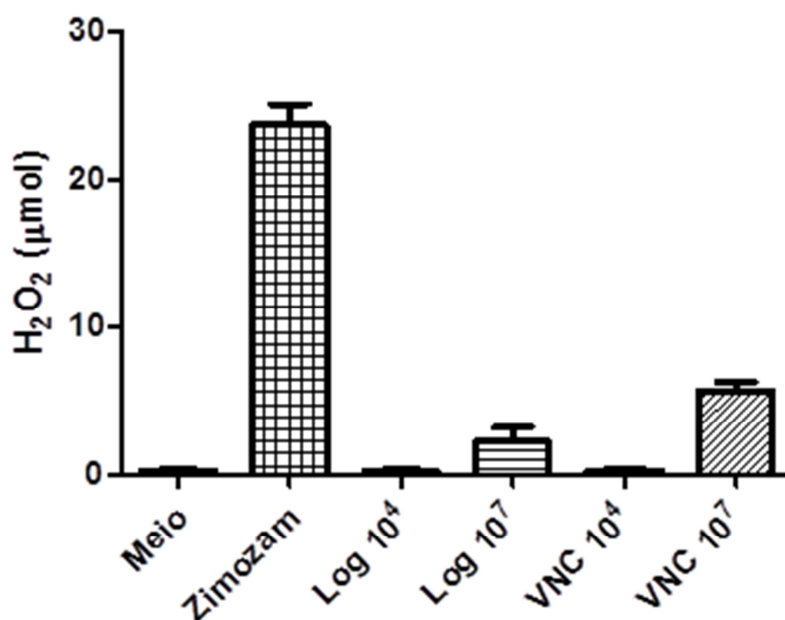


Figura 4. Produção de  $H_2O_2$  por macrófagos peritoneais em presença de doses consideradas infecciosa e não infecciosa de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 em fase logarítmica de crescimento e no estado viável não cultivável.

Meio - controle negativo: macrófagos crescidos de meio; Zimozam - controle positivo: macrófagos crescidos de zimozam  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; Log  $10^4$  - macrófagos expostos à densidade populacional de  $10^4$  de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 na fase logarítmica; Log  $10^7$  - macrófagos expostos à densidade populacional de  $10^7$  de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 na fase logarítmica; VNC  $10^4$  - macrófagos expostos à densidade populacional de  $10^4$  de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC; VNC  $10^7$  - macrófagos expostos à densidade populacional de  $10^7$  de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC.

### **4.3. Composição de ácidos graxos totais de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 submetida a estresses e no estado VNC**

O perfil de ácidos graxos totais de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963, apresentado na Tabela 2, foi estabelecido por cromatografia gasosa. Foram encontrados dez ácidos graxos: C12:0, C14:0, C14:0 3OH/ 16:1 iso I, C16:0, 16:1 w7c/ 16:1 w6c, C16:1 w5c, 17 ciclo, C18:0 w7c, C18:1 e 19 ciclo quando as células foram cultivadas em meio BHI a 37 °C (controle). As células submetidas a condições de estresse por cinco dias (frio, osmótico, nutricional e em conjunto) apresentaram além desses dez, outros ácidos graxos em porcentagens menores, como C13:0, C17:0, C17:1, C18:3, C20:1. Nas células em diferentes tempos de permanência no estado VNC, foi observada uma composição de ácidos graxos similar ao controle (Tabela 2), porém com porcentagens relativas diferentes, com exceção do ácido graxo C12:0 que foi encontrado somente nas células com 15 dias no estado VNC e o ácido graxo C16:1 w5c, ausente em todas as células no estado VNC, independente do tempo de permanência nesta condição.

Tabela 2. Percentual dos ácidos graxos totais de membrana de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 submetida a estresse frio, osmótico, nutricional, aos três estresses combinados e em diferentes tempos de permanência no estado viável não cultivável.

Amostras	C14:0	C16:0	C16:1	17 ciclo	C18:0	C18:1	19 ciclo	Outros <sup>A</sup>	AGS <sup>B</sup>	AGI <sup>C</sup>	AGC <sup>D</sup>	Razão AGI/AGS
Controle <sup>1</sup>	3,95	32,39	15,64	17,46	0,53	26,08	3,74	0,20	37,07	41,72	21,20	1,12
Estresse frio <sup>2</sup>	5,01	29,25	35,42	6,17	0,40	23,01	0,43	0,27	34,93	58,43	5,89	1,67
Estresse osmótico <sup>3</sup>	9,65	29,61	11,27	28,55	1,33	5,21	2,25	1,34	41,01	16,14	30,80	0,40
Estresse nutricional <sup>4</sup>	7,10	34,60	11,18	19,79	1,00	15,78	8,90	1,65	44,04	26,96	28,69	0,61
Três estresses <sup>5a</sup>	2,44	31,29	21,88	7,93	0,88	33,91	1,13	0,12	34,61	55,59	9,06	1,60
Três estresses (45 dias) <sup>5b</sup>	4,70	31,65	27,28	5,32	0,82	28,99	0,57	0,56	37,17	56,27	5,89	1,51
VNC (15 dias) <sup>6a</sup>	4,56	33,15	28,68	5,00	0,62	26,73	0,53	0,45	38,78	53,63	5,53	1,38
VNC (60 dias) <sup>6b</sup>	7,62	29,61	25,35	5,17	1,08	30,67	1,01	-	37,81	56,02	6,18	1,48
VNC (90 dias) <sup>6c</sup>	5,99	30,53	24,19	6,36	1,20	30,6	0,99	-	37,73	54,79	7,35	1,45
VNC (300 dias) <sup>6d</sup>	5,36	34,24	21,87	7,40	3,11	26,60	1,43	-	42,71	48,47	8,83	1,13

<sup>1</sup>- Células cultivadas em caldo BHI a 37°C até a fase logarítmica conforme descrito no item 3.1.

<sup>2</sup>- Células em meio BHI incubadas à temperatura de 4°C por 5 dias conforme descrito no item 3.5.1.

<sup>3</sup>- Células em meio BHI contendo 1,2 mM de NaCl incubadas à temperatura de 37°C por 5 dias conforme descrito no item 3.5.1.

<sup>4</sup>- Células em solução BPS incubadas à temperatura de 37°C por 5 dias conforme descrito no item 3.5.1.

<sup>5</sup>- Células em solução BPS contendo 1,2 mM de NaCl incubadas à temperatura de 4°C conforme descrito no item 3.5.1. <sup>5a</sup>- Incubação por 5 dias e <sup>5b</sup>- incubação por 45 dias.

<sup>6</sup>- Células em solução BPS contendo 1,2 mM de NaCl incubadas à temperatura de 4°C por 70 dias conforme descrito no item 3.3.

Permanência no estado viável não cultivável por <sup>6a</sup>- 15 dias; <sup>6b</sup>- 60 dias; <sup>6c</sup>- 90 dias e <sup>6d</sup>- 300 dias.

<sup>A</sup>- Ácidos graxos (C:13; C:17; C17:1, C18:3, C20:1) encontrados em menores porcentagens;

<sup>B</sup>- Ácidos graxos saturados;

<sup>C</sup>- Ácidos graxos insaturados;

<sup>D</sup>- Ácidos graxos cíclicos.

As porcentagens de ácidos graxos saturados (AGS), insaturados (AGI) e cíclicos (AGC) foram utilizadas para comparar as diferenças entre os ácidos graxos de membrana de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis nos diferentes tratamentos (Tabela 2). A razão AGI/AGS é comumente utilizada como indicador de fluidez da membrana (Casadei *et al.*, 2002; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2008), considerando que quanto maior a razão, maior é a fluidez da membrana. Quando células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis foram submetidas a diferentes tipos de estresses inclusive no estado VNC apresentaram diferenças na composição do perfil de ácidos graxos entre as células, o que representa uma resposta global às condições extremas às quais estas foram submetidas.

A proporção de AGS das células do tratamento controle foi similar a das células submetidas aos três estresses combinados por cinco dias e por 45 dias (Figura 5) e entre as células nos diferentes tempos de permanência no estado VNC exceto pelas, porém, nas células com maior tempo de permanência (300 dias). Já a proporção de AGI apresentou mudanças nas células submetidas a diferentes condições de estresses, nas células no estado VNC e durante a entrada no estado VNC. A porcentagem de AGI aumentou nas células durante o período de indução do estado VNC, no estresse frio e nas células no estado VNC, independente do tempo de permanência, porém diminuiu nas células submetidas ao estresse osmótico e ao estresse nutricional (*starvation*). A proporção de AGC variou entre todos os tratamentos, nas células submetidas ao estresse osmótico e frio foi observado um aumento na porcentagem de AGC de 30,80 % e 28,69 %, respectivamente, já nos outros tratamentos, a proporção diminuiu acentuadamente, até 3,83 vezes em relação ao controle (Tabela 2).

A razão AGI/AGS variou entre as células nas diferentes condições de estresse. A razão aumentou nas células em estresse frio e nas células submetidas aos três estresses combinados por cinco dias e por 45 dias e diminuiu nas células em estresse osmótico e nutricional. Nas células VNC, a razão apresentou um aumento, exceto nas com maior tempo de permanência no estado VNC (300 dias).

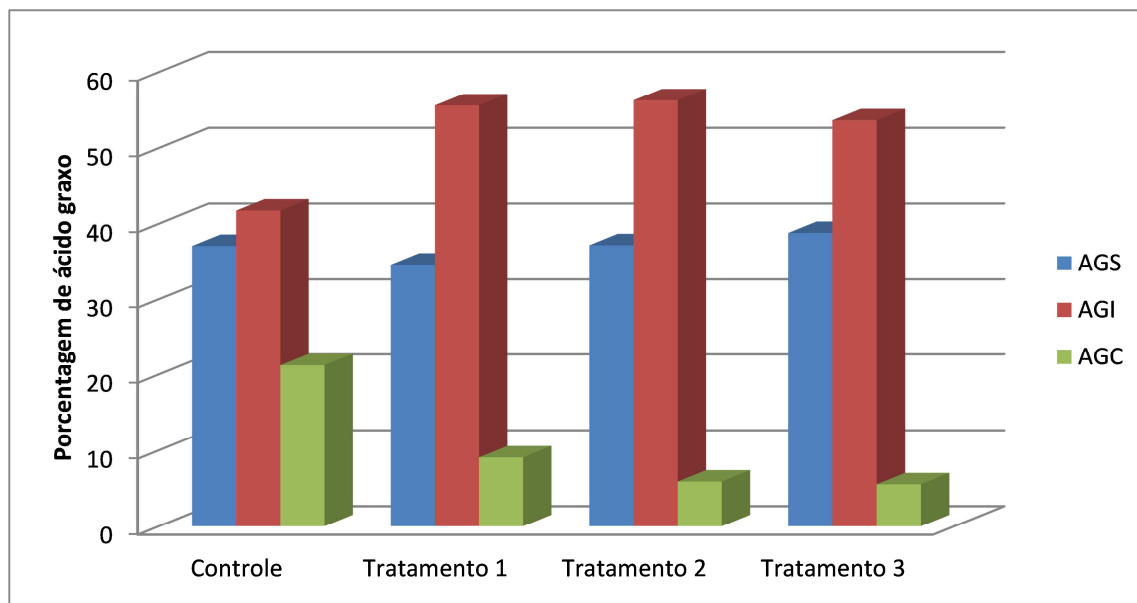


Figura 5. Perfil de ácidos graxos em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 durante a entrada no estado viável não cultivável.

Controle - Células cultivadas em caldo BHI a 37°C até a fase logarítmica conforme descrito no item 2.1. ; Tratamento 1 - Células em solução BPS contendo 1,2 mM de NaCl incubadas à temperatura de 4°C por 5 dias conforme descrito no item 3.5.1. ; Tratamento 2 - Células em solução BPS contendo 1,2 mM de NaCl incubadas à temperatura de 4°C por 45 dias conforme descrito no item 3.5.1. ; Tratamento 3 - Células em solução BPS contendo 1,2 mM de NaCl incubadas à temperatura de 4°C por 70 dias conforme descrito no item 3.3.

#### 4.4. Alterações morfológicas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC

As alterações morfológicas variaram quanto à forma e ao tamanho celular nas células de *Salmonella* Enteritidis no estado VNC quando comparadas com as células viáveis na fase exponencial. As células apresentaram transição da forma bacilar para a forma cocóide e redução de tamanho, independente do período de permanência no estado VNC. Houve redução drástica nas dimensões celulares área, volume, perímetro, diâmetro e comprimento das células VNC (Tabela 3). As células VNC apresentaram volume celular até 15,8 vezes menor que das células submetidas a condições ótimas de crescimento. Embora as células VNC tenham apresentado redução do tamanho celular (redução de 2,5 vezes do comprimento) se comparado ao das células em fase logarítmica, foi possível observar um aumento progressivo do tamanho celular, durante o período de permanência no estado VNC até 90 dias, as

Tabela 3. Dimensões celulares de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 na fase logarítmica e em diferentes tempos de permanência no estado viável não cultivável estimadas por meio de microscopia de força atômica.

Dimensões	Fase log	VNC 15 dias	VNC 60 dias	VNC 90 dias	VNC 300 dias
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	1,76* $\pm$ 0,28	0,35 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,00	0,55 $\pm$ 0,07	0,35 $\pm$ 0,06
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	1,27 $\pm$ 0,24	0,08 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,02
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	6,61 $\pm$ 1,04	2,30 $\pm$ 0,16	2,67 $\pm$ 0,08	2,95 $\pm$ 0,18	2,46 $\pm$ 0,30
Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	1,46 $\pm$ 0,12	0,68 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,00	0,84 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,05
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	2,51 $\pm$ 0,36	0,97 $\pm$ 0,09	1,15 $\pm$ 0,09	1,20 $\pm$ 0,09	1,18 $\pm$ 0,08

\* Média das dimensões de três células isoladas escolhidas ao acaso  $\pm$  o desvio padrão

células com maior tempo de permanência no estado VNC (300 dias) não seguiram o padrão das com menor tempo nesta condição. Além disso, as diferenças entre o comprimento e o diâmetro foram próximas (0,29; 0,36 e 0,37) nas células VNC em diferentes tempos de permanência neste estado, mostrando que apesar do aumento de tamanho, as células se mantiveram na forma cocóide.

## 5. Discussão

### 5.1. Características do gene *ssaB* e ativação de macrófagos em presença de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC

O gene de *Salmonella* Enteritidis sequenciado está presente na ilha de patogenicidade II (SPI-2). Esta apresenta aproximadamente 25 kb de genes adquiridos horizontalmente que permitem que *Salmonella* sobreviva e replique intracelularmente em seus hospedeiros. A SPI-2 codifica um sistema de secreção tipo III, responsável por secretar moléculas efetoras, translocadores, além disso, possui um sistema de dois componentes que controla sua própria expressão e a expressão das moléculas efetoras (OCHMAN *et al.*, 1996; EPHRAIM e GROISMAN, 2009). Essas moléculas efetoras como a codificada pelo gene *ssaB*, facilitam a sobrevivência e replicação em células fagocíticas hospedeiras alterando o citoesqueleto, vias de transdução de sinais e tráfico de vesículas (ABRAHAMS *et al.*, 2006). A função gene *ssaB* foi confirmada por ensaios de imunofluorescência e fracionamento subcelular, codificando uma molécula efetora translocadora que interfere no tráfico celular das vesículas (UCHIYA *et al.*, 1999). Dessa forma, acredita-se que a proteína SsaB iniba o tráfico intracelular impedindo a fusão das vesículas contendo *Salmonella* com o lisossomo e endossomos (COLLAZO *et al.*, 1997).

A identificação das regiões potenciais -35 e -10 foi baseada na sequência consenso TTGACA (-35) e TATAAT (-10) como determinado pelo Hawley e McClure (1983), assim o promotor do gene *ssaB* apresenta dois nucleotídeos conservados na região -35 e cinco nucleotídeos conservados na posição -10. Pela predição de promotores bacterianos por meio do programa BPROM, observou-se que o promotor é regulado ativamente por IHF, o fator de integração IHF é uma proteína considerada NAP (*Nucleoid-associated protein*), uma proteína de ligação ao DNA que auxilia na compactação do mesmo. As NAPs, como a IHF, são altamente expressas na fase exponencial de crescimento, apresentando grande importância na viabilidade e função celular (AZAM *et al.*, 1999). Além de atuar na compactação do genoma, IHF atua como um importante regulador transcricional de vários genes. Estudos com *E. coli* mostraram que na ausência de IHF os genes são *down* regulados,

principalmente na fase exponencial, onde geralmente os genes são expressos, pois é nessa fase de crescimento que o IHF é mais expresso (MANGAN *et al.*, 2006). Além disso, a célula perde a capacidade competitiva principalmente em ambientes onde há privação de nutrientes. Dessa forma, como o fator de integração IHF reconhece a região promotora, esta pode estar relacionada à expressão de genes localizados na SPI-2 que são importantes para a manutenção intracelular de *Salmonella*, garantindo sua sobrevivência (FASS e GROISMAN, 2009).

Por não apresentarem crescimento nas células no estado VNC, os genes presentes na SPI-2 provavelmente não estejam sendo expressos. O IHF é expresso principalmente em fase exponencial de crescimento, havendo grandes chances do fator de integração estar ausente ou em uma concentração basal, quando não há multiplicação celular. Como IHF é uma proteína ativadora e necessária para a ativação dos genes relacionados à sobrevivência intracelular, sua baixa concentração ou ausência impediria a expressão dos genes presentes na SPI-2. A expressão do gene *ihf* pode ter cessado durante o tempo em que as células estavam entrando no estado VNC, pois a condição extrema de estresse impede seu crescimento. Nos primeiros dias de incubação em solução fosfato de Butterfield (BPS) 7,35 mmol.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, acrescida 1,2 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio, há perda considerável da culturabilidade da população (MENDES, 2009).

O gene *ssaB* apresenta alta identidade com os outros sorovares de *Salmonella* mesmo para aqueles sorovares adaptados a hospedeiros diferentes, como suínos, aves e humanos. Isso mostra que tal gene é importante para a manutenção da virulência em *Salmonella* independente do hospedeiro. A identificação e a confirmação da identidade do gene *ssaB* é relevante porque na literatura já foi observado sorovares de *Salmonella* apresentando as ilhas de patogenicidade típicas, porém com alguns genes ausentes (BHOWMICK, *et al.*, 2001). Nos ensaios de ativação de macrófagos, a presença do produto do gene *ssaB* é essencial para a sobrevivência no interior de macrófagos, pois impede a formação do fagolisossomo. Entretanto, quando se compara a sequência de aminoácidos da proteína SsaB do isolado com as sequências do banco de dados, observa-se que outras subespécies de *Salmonella* encontram-se distantes do isolado em estudo. Além disso, a proteína apresenta similaridade com proteínas de outras espécies de enterobactérias, em virtude do genoma ser degenerado. Isso mostra que as sequências de nucleotídeos são conservadas, mas seu

produto não, talvez a proteína seja importante para a patogenicidade em outros membros da família Enterobacteriaceae.

As células fagocitadas pelos macrófagos estão sujeitas a morte por mecanismos que incluem o tráfico para ambientes degradativos (lisossomo), acidificação do meio, produção de hidrolases, proteases, reativos tóxicos de oxigênio pelo sistema oxidase fagocítica dependente de NADPH (Phox) e a produção de intermediários de nitrogênio pela óxido nítrico sintase. A oxidase fagocítica NADPH está presente na membrana do fagolisossomo e bombeia elétrons para dentro do compartimento, reduzindo o oxigênio em ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A óxido nítrico sintase produz NO que pode ser convertido em outros radicais nitrogenados chamados de intermediários reativos de nitrogênio (RNI). Esses produtos atuam no patógeno causando danos em várias biomoléculas, principalmente no DNA (SLAUCH, 2011). Entretanto, mesmo com esses mecanismos de defesas, *Salmonella* possui estratégias de escape do sistema de defesa do hospedeiro, sobrevivendo dentro de fagossomos modificados chamados de vacúolo contendo *Salmonella* (MORTIMER, 2008). O sucesso de *Salmonella* no processo de infecção está intimamente relacionado com a ilha de patogenicidade II. Estudos com mutantes de SPI-2 confirmaram a perda da virulência, da capacidade de sobrevivência e de replicação intracelular em macrófagos e outros tipos celulares não fagocíticos (OCHMAN *et al.*, 1996; HENSEL *et al.*, 1998). A SPI-2 apresenta genes que codificam para o sistema de secreção tipo III, além de moléculas efetoras e translocadores que são liberadas no macrófago ou outro tipo celular pelo sistema de secreção, impedindo assim a fusão do lisossomo ao vacúolo contendo *Salmonella* (SCV) e alterando o tráfico vesicular, reduzindo a sua exposição aos mecanismos de defesa do hospedeiro como as espécies reativas de oxigênio e os intermediários reativos de nitrogênio (CHAKROVORTTY *et al.*, 2002). Tal ilha de patogenicidade apresenta genes que impedem a co-localização entre a SCV e NADPH oxidase (VAZQUEZ *et al.*, 2000), alteram o tráfico de espécies reativas de nitrogênio, dando ao patógeno, chances de sobrevivência intracelular. Além disso, a SPI-2 possui outros genes requeridos para o estresse osmótico como o *katE*, *katG*, *sod*, *rpoS* e *slyA* que codificam para enzimas que degradam  $H_2O_2$  sendo três catalases e duas hidropéroxido (HEBRARD *et al.*, 2009). Estudos com mutantes de *Salmonella* na síntese dessas enzimas em presença de macrófagos resultaram na atenuação da

virulência, mostrando sua importância na resposta ao estresse oxidativo causado pelo hospedeiro (HEBRARD *et al.*, 2009).

Embora não tenha sido observada a fagocitose de células VNC de *Salmonella* por microscopia óptica (Figura 3), a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> confirmou a ativação dos macrófagos. Como observado na Figura 4, as células VNC induziram maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos que as na fase logarítmica. Esta menor produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos na presença de células de *Salmonella* em fase logarítmica pode estar relacionada à expressão de genes presentes na SPI-2 em células em crescimento ativo, relacionado à capacidade de *Salmonella* evitar a liberação de reativos de oxigênio como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas SCV. Além disso, *Salmonella* pode evitar a degradação de tais reativos por enzimas degradadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> codificadas por essa ilha e assim, a menor produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentam as chances de sobrevivência intracelular. Em células de *Salmonella* Enteritidis no estado VNC, por não apresentarem crescimento, a SPI-2 pode não estar sendo expressa em virtude da ausência da proteína ativadora IHF nesta condição, assim tais células não seriam capazes de degradar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou impedir sua liberação, apresentando uma maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos, sugerindo que células VNC de *Salmonella* são menos virulentas. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variou em relação à concentração microbiana, em doses consideradas não-infecciosas (10<sup>4</sup> UFC), tanto nas células VNC quanto na fase logarítmica, não foi percebida produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos. Por esses resultados acredita-se que para que haja uma produção perceptiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seria necessária uma população microbiana maior ativando um número maior de macrófagos que liberaria uma quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detectável.

## **5.2. Composição de ácidos graxos totais de membrana de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC**

Dentre as várias adaptações ao estresse apresentadas por bactérias, a modificação do perfil de ácidos graxos da membrana citoplasmática é conhecida, e normalmente relacionada como forma de adaptação. Os perfis de ácidos graxos totais de membrana de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 em fase logarítmica foram semelhantes aos já descritos para o mesmo sorovar (SAMPATHKUMAR *et al.*, 2004), para *Salmonella* sorovar Typhimurium (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008), para *Salmonella* sorovar Senftenberg CECT

4384 (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009), além de outras bactérias gram-negativas como *E. coli* (CASADEI *et al.*, 2002). Aumentos nos percentuais de ácidos graxos insaturados e da razão AGI/AGS, foram observados em células de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 submetidas ao estresse frio, à combinação dos três estresses e nas células no estado VNC (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados com *Salmonella* Typhimurium (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008), *Salmonella* Senftenberg (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009), *E. coli* (CASADEI *et al.*, 2002) quando estas bactérias foram submetidas ao estresse frio. Por outro lado, trabalhos com *L. acidophilus* apresentaram resultados contraditórios em relação aos ácidos graxos insaturados e à razão AGI/AGS (FERNÁNDEZ MURGA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2005). Os estudos realizados com *Salmonella* (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008 e ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009) mostram porcentagem de ácidos graxos insaturados e razão AGI/AGS (0,67) a uma temperatura mínima de 10°C inferiores aos resultados encontrados neste trabalho, onde a razão AGI/AGS foi de 1,67 para uma temperatura de 4°C. Esta diferença pode ser explicada por um possível aumento de ácidos graxos insaturados devido à diminuição da temperatura, levando a um aumento na razão AGI/AGS. Uma das respostas de *Salmonella* Enteritidis ao crescimento a baixas temperaturas é marcada pela alteração da composição lipídica da membrana, com o aumento do grau de insaturação. O aumento de ácidos graxos insaturados cria uma perturbação na membrana maior que os ácidos graxos saturados, resultando em uma membrana mais fluida (BEALES, 2004).

A redução de ácidos graxos cíclicos (AGC) foi observada em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 submetidas ao estresse frio, aos três estresses combinados e as células no estado VNC (Tabela 2 e Figura 5) e também em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008). Todavia, em *Salmonella* sorovar Senftenberg, a porcentagem de AGC aumentou em culturas refrigeradas (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009). Sabendo que os ácidos graxos cíclicos são mais estáveis que os insaturados, a redução de AGC acompanhada do aumento de AGI leva a um aumento ainda maior da fluidez da membrana (RUSSELL, 1990). Além dessas mudanças, é sabido que o aumento na proporção de ácidos graxos de cadeia mais curta também resulta em um aumento na fluidez da membrana, em virtude da diminuição das interações carbono-carbono entre as cadeias de ácidos graxos (RUSSELL, 1990), porém tal alteração não foi

observada em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 e em outros sorovares (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009). Quando a temperatura diminui, alguns componentes que normalmente são fluidos tornam-se semelhantes a géis impedindo o funcionamento correto da membrana, mas com o aumento da fluidez a formação gel não ocorre, permitindo a sobrevivência à nova condição (BEALES, 2004). Assim, acredita-se que para o funcionamento normal da célula, tais mudanças sejam importantes e necessárias de modo que o desempenho das proteínas, que realizam funções como bombeamento de sais, transporte de nutrientes e respiração, sejam mantidas mesmo em baixas temperaturas (BERRY e FORGEDING, 1997). Como a estocagem a baixas temperaturas causou uma redução na proporção de AGC, um aumento na porcentagem de AGI e na razão AGI/AGS, as células em condição de estresse frio, as submetidas aos três estresses combinados e as células no estado VNC apresentam uma maior fluidez da membrana.

Células de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 submetidas aos estresses osmótico e nutricional (Tabela 2) apresentaram um perfil de ácidos graxos semelhante, ao contrário das células submetidas ao frio ou aos três estresses combinados. Nas células submetidas ao estresse osmótico, observa-se a presença de ácidos graxos diferentes presentes em pequenas quantidades, um aumento relativo da porcentagem de AGC e diminuição de AGI em relação às células na fase logarítmica enquanto os AGS apresentaram pequena variação. Em estudos com mutantes de bactérias halofílicas (*Chromohalobacter salexigens*) sensíveis à salinidade observou-se a incapacidade de incorporar AGC, sendo deficientes na resposta ao estresse osmótico envolvendo alterações na membrana, já na linhagem selvagem houve uma diminuição de AGI e um aumento de AGC quando submetida ao estresse osmótico (VARGAS *et al.*, 2005). Nas células submetidas ao estresse nutricional, as mudanças ocorridas no perfil de ácidos graxos, como aumento na porcentagem de AGS, AGC e redução de AGI e consequentemente redução da razão AGI/AGS, permitiram uma maior rigidez da membrana. A maior rigidez da membrana impede que moléculas indesejáveis penetrem e que determinados solutos saiam em virtude da condição desfavorável (BROWN *et al.*, 1997), contribuindo assim para a integridade celular (RUSSELL, 1993; VALDERRAMA *et al.*, 1998). A principal ferramenta para tal proteção é o aumento de ácidos graxos cíclicos, que auxiliam no aumento da rigidez da membrana. Estudos mostram que a síntese de AGC na membrana durante a

aclimação ao estresse é um importante fator de proteção a outras condições de estresse (BROWN *et al.*, 1997).

O aumento da porcentagem de AGC também parece ser importante para o desenvolvimento de proteção cruzada contra outros estresses, como estresses ácido e térmico (BROWN, 1997; CHANG e CRONAN, 1999). Linhagens de *Salmonella* sorovares Enteritidis e Senftenberg quando submetidas ao estresse térmico e ao estresse ácido (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009) apresentaram perfil de ácidos graxos semelhante ao do sorovar Enteritidis PT4 963, quando submetido ao estresse osmótico e nutricional, isto é, aumento de AGC, diminuição de AGI e da razão AGI/AGS. Além disso, as células adaptadas ao estresse ácido apresentaram maior resistência ao tratamento térmico, que as células não adaptadas, mostrando a termotolerância de células submetidas a condições ácidas (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008). A semelhança no perfil de ácidos graxos sugere que as células de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 submetidas ao estresse osmótico e nutricional apresentem resposta cruzada a outros estresses.

A formação de AGC apresenta-se como uma modificação na bicamada lipídica e tem sido relatada em bactérias gram-negativas predominantemente na fase estacionária (RUSSEL, 1989; RUSSEL, 1993). Neste trabalho, as células de *Salmonella* Enteritidis em fase estacionária de crescimento mostraram aumento do ácido graxo 19 ciclo w8c de 3,71% do controle para 13,54% (dados não apresentados). Os ácidos graxos cíclicos são formados por uma enzima denominada AGC sintase que adiciona um grupo metileno do S-adenosil-L-methinina na ligação dupla da porção fosfolipídica do ácido graxo insaturado, ou seja, ocorre uma conversão de AGI para AGC. Assim, pelos resultados obtidos, observa-se que houve uma conversão relevante de AGI em AGC durante a aclimação em células de *Salmonella* submetidas ao estresse osmótico e nutricional e acredita-se que essa conversão auxilia na proteção contra condições estressantes devido à redução da fluidez e diminuição da permeabilidade da membrana (DUNKLEY *et al.*, 1991). As modificações do perfil de ácidos graxos tem sido implicadas à adaptação da bactéria a vários fatores estressantes, como temperatura, estresse osmótico, ácido e entrada na fase estacionária (RUSSELL, 1995; VARGAS *et al.*, 2005; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2009). Essas alterações devem ser importantes para a manutenção da célula a condições não favoráveis garantindo a integridade e funcionalidade da membrana.

O perfil de ácidos graxos de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis durante a indução ao estado VNC (Figura 5) apresentou uma alteração gradual no perfil, havendo diminuição da porcentagem de ácidos graxos cíclicos à medida que as células eram mantidas por mais tempo em condição de estresse frio, osmótico e nutricional até a entrada no estado VNC de 100% das células. Em condição de estresse por 5 dias há, possivelmente, apenas células viáveis cultiváveis estressadas, no entanto, após 45 dias parte delas encontra-se no estado VNC, o que justifica que o perfil destas seja similar ao das células VNC. Esta alteração gradual na porcentagem de AGC pode estar relacionada ao aumento de células no estado VNC e da adaptação por um longo período a uma condição extrema de estresse. Células de *V. vulnificus* no estado VNC apresentaram alterações estatisticamente significativas no perfil de ácidos graxos nas primeiras 4 horas na condição de baixa temperatura e escassez nutricional (indução do estado VNC), havendo aumento de AGI (DAY e OLIVER, 2004). Estes autores induziram o estado VNC em *V. vulnificus* na presença de um inibidor de ácido graxo e alterações no perfil não foram observadas, além das células perderem sua viabilidade após 15 dias de incubação (DAY e OLIVER, 2004). Dessa forma, percebe-se que tais alterações no perfil de ácidos graxos são importantes para a entrada das células no estado VNC. Essas mudanças, essenciais para que *Salmonella* Enteritidis entre no estado VNC, ocorreram por efeito da combinação de temperatura baixa, escassez nutricional e estresse osmótico. Porém quando comparado o perfil de ácido graxo das células submetidas a condições de estresse separadamente observa-se que estes não são semelhantes ao estresse osmótico e nutricional, mas é similar ao perfil de células submetidas ao estresse frio (Tabela 2). Isso mostra que as alterações no perfil de ácidos graxos são importantes para a adaptação à temperatura baixa. Além disso, *Salmonella* Enteritidis pode estar respondendo as outras condições de estresse osmótico ou nutricional de outra forma, expressando genes de resposta ao estresse que não as modificações na bicamada lipídica.

Não houve alterações no perfil de ácidos graxos totais de *S. Enteritidis* PT4 963 entre os diferentes tempos de permanência no estado VNC, porém os perfis de ácidos graxos de células de *Salmonella* no estado VNC foram diferentes ao do controle. Observa-se um aumento gradual de AGC quanto maior o tempo de permanência no estado VNC e um aumento de AGI nas células com menor tempo de permanência neste estado (15 dias e 60 dias). Em contrapartida, após este período de

60 dias no estado VNC observou-se uma redução nos ácidos graxos insaturados tornando-se menores que os das células com 15 dias no estado VNC, enquanto a porcentagem de AGS se manteve constante independente do tempo de permanência no estado VNC. Além disso, é possível constatar no perfil a ausência de ácidos graxos de menor porcentagem como o C12:0 que pode ser devida à redução da taxa metabólica e consequente diminuição da síntese de macromoléculas, como determinados fosfolípidos conforme descrito na literatura para as células VNC (OLIVER, 2005). Essas pequenas alterações no perfil mostram que a célula apresenta uma adaptação temporal à condição estressante. Uma alteração mais evidente pode ser observada em *Salmonella* com maior tempo de permanência no estado VNC em relação às outras, houve um aumento na porcentagem de AGS e AGC e diminuição na razão AGI/AGS assemelhando ao controle. Essas mudanças no perfil podem estar relacionadas ao longo período de permanência a uma condição extrema de estresse e sua perda da capacidade de adaptação à mesma. Não há relatos na literatura descrevendo as alterações no perfil de ácidos graxos de células no estado VNC em relação ao seu tempo de permanência nesta condição, sendo um dado novo e de grande importância para estudos posteriores, sobre o comportamento dessas células neste estado fisiológico.

### **5.3. Alterações morfológicas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963 no estado VNC**

As alterações morfológicas, observadas para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 963, como mudança para a forma cocóide e redução de tamanho são características conhecidas para células no estado VNC (GUPTE *et al.*, 2003; OLIVER, 2010). Mudanças para forma cocóide e redução do tamanho em células no estado VNC foram observadas em vários micro-organismos como para *Salmonella bovis* *morbificans* no estado VNC, o que foi demonstrado por microscopia de força atômica (ABDALLAH *et al.*, 2007), por microscopia eletrônica de varredura, de transmissão ou de epifluorescência para *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 (GUPTE *et al.*, 2003), para *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis PT4 963 e CCS3 (MENDES, 2009), para *E. coli* (FLORESTA, 2006), *V. harveyi* (SUN *et al.*, 2008), *V. cholerae* (CHAIYANAN *et al.*, 2007), *Vibrio*

*alginoliticus* (ALBERTINI *et al.*, 2006), *Campylobacter* sp. (REEZAL *et al.*, 1998) e *E. tarda* (DU *et al.*, 2006; MENG *et al.*, 2006).

As células de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 no estado VNC apresentaram uma forte redução do volume de até 15,8 vezes seu conteúdo. Esta redução pode estar relacionada à alta concentração salina do meio de indução do estado VNC a qual resulta na perda de água da célula para o meio externo, que pode contribuir consideravelmente para a diminuição do volume citoplasmático na tentativa de contrabalancear a diferença de osmolaridade com o meio externo (CSONKA, 1989). Estudos com *Brevibacterium lactofermentum* e *Corynebacterium glutamicum* em condição de estresse osmótico com NaCl, mostraram a redução linear do tamanho e volume citoplasmático com o aumento do estresse osmótico (SKJERDAL *et al.*, 1995). Em virtude de a membrana ser impermeável à maioria dos metabólitos, o estresse hiperosmótico causa efluxos instantâneos de água acompanhados por uma drástica redução do volume citoplasmático (CSONKA, 1989). Além disso, a mudança da forma bacilar para a cocóide possivelmente está relacionada à proteína MreB, homóloga à actina eucariótica, que fazem parte do citoesqueleto. MreB está relacionada à morfogênese e desempenha um papel vital na definição da morfologia bacilar em bactérias, respondendo a condições de estresse. Estudos com *Vibrio* no estado VNC mostraram que MreB encontra-se distribuída em toda célula ao invés de formar a hélice que garante a morfologia bacilar (CHIU *et al.*, 2008) .

Embora as células VNC tenham apresentado um menor tamanho se comparado ao das células em fase logarítmica, observou-se um aumento progressivo do tamanho celular com o tempo de permanência das células no estado VNC (Tabela 3). Esta correlação entre aumento celular com tempo de permanência no estado VNC não foi previamente descrita na literatura, mas uma hipótese para explicar tal fato seria uma possível adaptação lenta à condição de estresse osmótico. Sabe-se que um mecanismo por meio do qual as bactérias respondem ao estresse hiperosmótico, envolve o acúmulo de solutos compatíveis, moléculas polares e altamente solúveis como, glicina, betaína, prolina, ectoína, carnitina, colina e trealose ou íons como potássio que não afetam as funções normais da célula, mesmo em altas concentrações (WHITE, 2000; WOOD *et al.*, 2001; O'BYRNE e BOOTH, 2002; YOUSEF e JUNEJA, 2003). Tal acúmulo pode ter ocorrido lentamente durante a permanência das células no estado VNC, o que pode ter permitido um ganho gradual de água do meio e que, conseqüentemente, resultou no aumento do tamanho da célula. Sabe-se

que em um estresse osmótico não muito severo, após a adaptação a nova condição, o volume celular é aumentado pela própria célula (CSONKA, 1998), dessa forma, mesmo o estresse osmótico sendo drástico, o tempo em que *Salmonella* manteve-se nesta condição pode ter sido suficiente para a sua adaptação a partir de acúmulo de solutos compatíveis, aumentando seu tamanho e volume celular. Entretanto, as células com maior tempo de permanência no estado VNC não seguiram o mesmo padrão das outras, havendo redução de suas medidas e manutenção de seu comprimento. Devido ao longo tempo que essas células permaneceram no estado VNC, elas podem perder a capacidade de acumular solutos compatíveis, reduzindo seu volume e, conseqüentemente, seu tamanho.

Curiosamente, esse comportamento de redução drástica e posterior aumento dos parâmetros morfológicos ao longo do período de permanência das células no estado VNC, pode ser observado também no perfil de ácidos graxos de membrana de *Salmonella* Enteritidis PT4, principalmente em relação aos AGC, que apresentaram uma redução e posterior aumento à medida que aumentava o tempo de permanência no estado VNC. Além disso, pode ser observado o aumento da rigidez da membrana plasmática quanto maior o tempo no estado VNC. No maior tempo de permanência no estado VNC avaliado (300 dias), as dimensões celulares apresentaram-se menores e similares àquelas obtidas no menor tempo de permanência. Este comportamento também foi observado na avaliação do perfil de ácidos graxos. A porcentagem de AGI e a razão AGI/AGS diminuíram ou não se alteraram nas células VNC após 300 dias, enquanto a porcentagem de AGS aumentou. Em virtude das mudanças na morfologia e no perfil de ácidos graxos terem apresentado comportamentos semelhantes, pode ser que as alterações nos lipídeos de membrana podem estar relacionadas às mudanças nas dimensões celulares de *Salmonella* Enteritidis PT4 no estado VNC.

## **6. Conclusões e Perspectivas**

Neste trabalho se confirmou que o isolado *Salmonella* Enteritidis PT4 963 apresenta o gene *ssaB*, e que o produto do gene possui similaridade com proteínas efetoras presente em outras espécies.

Em dose considerada infecciosa ( $10^7$  UFC) tanto as células em condição ótima de crescimento quanto as VNC ativam macrófagos peritoneais, porém em células no estado VNC sugere-se que o gene *ssaB* não está sendo expresso, visto que não há impedimento da produção de  $H_2O_2$  como nas células em fase logarítmica.

O perfil de ácidos graxos de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 foi diferente nas condições de estresse e no estado VNC, a alteração do perfil de ácidos graxos de células VNC possivelmente está relacionada à adaptação a baixas temperaturas.

Foi confirmada a mudança da morfologia celular de *Salmonella* Enteritidis no estado VNC passando de forma bacilar para a forma cocóide e redução das dimensões celulares (área, volume, perímetro, comprimento e diâmetro). Foi constatado aumento gradual das dimensões das células em relação ao tempo de permanência no estado VNC que pode estar relacionado a uma adaptação gradual à condição de estresse.

Células mantidas por até 90 dias no estado VNC apresentaram perfis de ácidos graxos e morfologia semelhantes, mas células com maior tempo de permanência neste estado (300 dias) apresentaram alterações tanto no perfil de ácidos graxos como nas dimensões celulares. Em virtude desse comportamento semelhante, sugere-se que as alterações nos lipídeos de membrana podem estar relacionadas às mudanças na morfologia de *Salmonella* Enteritidis PT4 no estado VNC.

Dessa forma, há necessidade de maiores estudos para o conhecimento das alterações do perfil de ácidos graxos na manutenção no estado VNC e para a confirmação da relação das alterações do perfil de ácidos graxos com a mudança morfológica. Além disso, trabalhos devem ser realizados para conhecer a função da proteína MreB na mudança para a forma cocóide no estado VNC. Mais estudos são necessários para a caracterização dos genes de virulência de *Salmonella* Enteritidis PT4 963 e na expressão destes no estado VNC. Pesquisas devem ser realizadas para a confirmação da manutenção da virulência ou atenuação de *Salmonella* Enteritidis no estado VNC por ensaios de aderência e invasão em células eucarióticas e posteriormente em modelos murinos.

## 7. Referências Bibliográficas

ABDALLAH, F. B.; LAGHA, R., BAKHROUF, A. Resuscitation and morphological alterations of *Salmonella bovis* cells under starvation in soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1507-1512, 2007.

ABRAHAMAS, G. L.; HENSEL, M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamics interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. **Cellular Microbiology**, v. 8, p. 728-737, 2006.

ALBERTINI, M. C.; ACCORSI, A.; TEODORI, L.; PIERFELICI, L.; UGUCCIONI, F.; ROCCHI, M. B. L.; BURATTINI, S.; CITTERIO, B. Use of multiparameter analysis for *Vibrio alginolyticus* viable but nonculturable state determination. **Cytometry Part A**, v. 69, p. 260-265, 2006.

ALEXANDER, E.; PHAM, D.; STECK, T. R. The viable but nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3754-3756, 1999.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ, M.; ARENAS, R.; BERBARDO, A. Modifications in membrane fatty composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 212-219, 2008.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ, M.; BERBARDO, A. Relationship between membrane fatty acid composition and heat resistance of acid and cold stressed *Salmonella senftenberg* CECT 4384. **Food Microbiology**, v. 26, p. 347-353, 2009.

AMRO, N. A.; KOTRA, L. P.; KAPILA, W.; BULYCHEV, A.; MOBASHERY, S.; LIU, G. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: Structural basis for permeability. **Langmuir**, v. 16, p. 2789-2796, 2000.

ASAKURA, H.; KAWAMOTO, K.; HAISHIMA, Y.; IGIMI, S.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, S. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 709-717.2008.

ASAKURA, H.; MAKINO, S.; TAKAGI, T.; KURI, A.; KURAZONO, T.; WATARAI, M.; SHIRAHATA, T. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 87-93, 2002.

ASAKURA, H.; PANUTDAPORN, N.; KAWAMOTO, K.; IGIMI, S.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, S. Proteomic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the oxidation-induced viable but nonculturable state. **Microbiology and Immunology**, v 51, n. 9, p. 875-881, 2007.

AZAM, T. A.; IWATA, A.; NISHIMURA, A.; UEDA, S.; ISHIHAMA, A. A. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6361-6370, 1999.

BAFFONE, W.; CITTERO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; CAMPANA, R.; FALZAWO, L.; DONELLI, G. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 31-39, 2003.

BALASUBRAMANIAN, G.; STUART, M. R.; WEIMER B. C. Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2498-2512, 2007.

BALEUX, B.; CARO, A.; LESNE, J.; GOT, P.; BINARD, S.; DELPEUCH, B. Survie et maintien de la virulence de *Salmonella typhimurium* VNC exposée simultanément à trois facteurs stressants expérimentaux. **Oceanologica Acta**, v. 21, p. 939-950, 1998.

BAUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v. 287, p. 50-52, 2000.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. **Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20, 2004.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M. E.; CAPPELIER, J. M. Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. **Food Microbiology**, v. 17, p. 697-704, 2000.

BERRY, E. D.; FOEGEDING, P. M. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 12, p.1583-1594, 1997.

BHOMICK, P. P.; DEVEGOWDA, D.; RUWANDEEPIKA, D. H. A.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Presence of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes in seafood-associated *Salmonella* serovars and the role of the *sseC* gene in survival of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in epithelial cells. **Microbiology**, v. 157, p. 160-168, 2011.

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. H. Atomic force microscopy. **Physical Review Letters**, v. 56, p. 930-933, 1986.

BRAGA, P. C.; RICCI, D. **Methods in Molecular Biology**, v. 242. Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Application. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 394p., 2004

BRAGA, P. C.; RICCI, D. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 18-22, 1998.

BROWN, J. L.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A.; NICHOLS, P. D. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 163-73, 1997.

BULLIS, K. L. The history of avian medicine in the U.S. Pullorum disease and fowl typhoid. **Avian Diseases**, v. 21, p. 422-429, 1977.

CAPPELIER, J. M.; BESNARD, V.; ROCHE, S.; GARREC, N.; ZUNDEL, E.; VELGE, P.; FEDERIGHI, M. Avirulence of viable but nonculturable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by *in vitro* and *in vivo* models. **Veterinary Research**, v. 36, p. 589-599, 2007.

CARO, A.; GOT, P.; LESNE, J.; BINARD, S.; BALEUX, B. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3229-3232, 1999.

CASADEI, M. A.; MANAS, P.; NIVEM, G.; NEEDS, E.; MACKEY, B. M. Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5965-5972, 2002.

CASTRO, F. A.; SANTOS, V. R.; MARTINS, C. H. G. M.; FERNANDES, S. A.; ZAIA, J. E.; MARTINEZ, J. R. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n.5, p.244-251, 2002.

CHAIYANAN, S.; CHAIYANAN, S.; GRIM, C.; MAUGEL, T.; HUG, A.; COLWELL, R. R. Ultrastructure of coccoid viable but nonculturable *Vibrio cholera*. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 393-402, 2007.

CHAIYANAN, S.; HUG, A.; MAUGEL, T.; COLWELL, R. R. Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 331-341, 2001.

CHAKRAVORTTY, I.; HANSEN-WESTER, M.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 455-470, 2002.

CHANG, Y. Y.; CRONAN, J. E. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 18, p. 357-366, 1999.

CHAVEERACH, P.; HUURNE, M. H. A. A.; LIPMAN, A. J. L.; KNAPEN, F. Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 711-714, 2003.

CHIU, S. W.; CHEN, S. Y.; WONG, H. Localization and expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under different stresses, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 22, p. 7016-7022, 2008.

COGAN, T. A.; HUMPHREY, T. J. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 114-119, 2003.

COLLAZO, C. M.; GALAN, J. E. The invasion-associated type III system *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 747-756, 1997.

COLWELL, R. R.; BRAYTON, P. R.; GRIMES, D. J.; ROSZAK, D. R.; HUQ, S. A.; PALMER, L. M. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment implication for release of genetically engineered microorganisms. **BioTecnology**, v. 3, p. 817-820, 1985.

COUTARD, F.; POMMEPUY, M.; LOAEC, S.; HERVIO-HEATH, D. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 951-961, 2005.

CSONKA, L. N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 53, n. 1, p. 121-147, 1989.

DAY, A.P.; OLIVER, J.D. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 69-73, 2004.

DREUX, N.; ALBAGNAC, C.; FEDERIGHI, M.; CARLIN, F.; MORRIS, C. E.; NGUYEN-THE, C. Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p. 1272-1281, 2007.

DU, M.; CHEN, J.; ZHANG, X.; AIJUAN, L.; LI, Y.; WANG, Y. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1349-1354, 2007.

DUBROVIN, E. V.; VOLOSHIN, A. G.; KRAEVSKY, S. V.; IGNATYUK, T. E.; ABRAMCHUK, S.S. Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria. **Langmuir**, v. 24, p.13068-13074, 2008.

DUNKLEY JR, E. A.; GUFFANTI, A. A.; CLEJAN, S.; KRULWICH, T.A. Facultative alkaliphiles lack fatty acid desaturase activity and lose the ability to grow at near-neutral pH when supplemented with an unsaturated fatty acid. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1331-1334, 1991.

EFRON, B.; HALLORAN, E.; HOLMES, S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 7085-7090, 1996.

FASS, E.; GROISMAN, E. A. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 199-204, 2009.

FEDERIGHI, M.; THOLOZAN, L. J.; CAPPELIER, M. J.; TISSIER, P. J.; JOUVE, L. M. Evidence of non-cocoid viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining and scanning electron microscopy. **Food Microbiology**, v. 15, p. 539-550, 1998.

FERNÁNDEZ, M. M. L.; CABRERA, G.; FONT DE VALDEZ, A.; DISALVO, A.; SELDES, A. M. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 342-348, 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FLORESTA, F. A. **Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 55p., 2006.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, p.173-187, 2007.

FUZHARA, T. O.; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. G. M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1749-1753, 2000.

GALANIS, E.; WONG, D. M. A. F.; PATRICK, M. E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHAIKIT, T. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p. 381-388, 2006.

GHEZZI, I. J.; STECK, R. T. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, p. 203-208, 1999.

GOLDSTEIN, J. I.; NEUBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D. C.; ROMING, A. D.; LYMAN, C. E.; FIORI, C.; LUFSHIN, E. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis**, 2<sup>nd</sup> ed., Plenum Press. Nova York, 270 p., 1992

- GREY, B.; STECK, R. T. Concentrations of copper thought to be toxic to *Escherichia coli* can induce the viable but nonculturable condition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5325-5327, 2001.
- GUPTE, A. R.; RESENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. Induction and resuscitation of nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6669-6675, 2003.
- GUNASEKERA, T. S.; SORENSEN, A.; ATTFIELD, P. V.; SORENSEN, S. J.; VEAL, D. A. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1988-1993, 2002.
- HAWLEY, D. K.; McCLURE, W. R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 11, n. 8, p. 2237-2255, 1983.
- HEBRARD, M.; VIALA, J. P.; MERESSE, S.; BARRAS, F.; AUSSEL, L. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 4605-4614, 2009.
- HEIM, S.; LLEÒ, M. D. M.; BONATO, B.; GUSMAN, C. A.; CANEPARI, P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteomic analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 6739-6745, 2002.
- HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 95-102, 2004.
- HENSEL, M.; SHEA, J. E.; WATERMAN, D. M.; MUNDY, R.; NOKOLAUS, T.; BANKS, G.; VAZQUEZ-TORRES, A.; GLEESON, C.; FANG, F.; HOLDEN, D. W. Genes encoding putative effector proteins of type III secretion system of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 163-174, 1998.
- HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R. V. *Salmonella* surveillance: A global survey of public health serotyping. **Epidemiology and Infection**, v.129, p. 1-8, 2002.
- HUMPHREYS, S.; STEVENSON, A.; BACON, A.; WEINHARDT, A. B.; ROBERTS, M. The alternative Sigma factor,  $\sigma^E$ , is critically important for the virulence of *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1560-1568, 1999.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLGEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. Food Science Text Series, 790 p., 2005.

JOLIVET-GOUGEON, A.; SAUVAGER, F.; BONNAURE-MALLET, M.; COLWELL, R. R.; CORMIER, M. Virulence of viable but nonculturable *S. Typhimurium* LT2 after peracetic acid treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 147-152, 2006.

KERFELD, C. A.; SCOTT, K. M. Using BLAST to Teach “e-value-tionary” Concepts. **PLoS Biology**, v. 9, n. 2, p. 1-4, 2011.

LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; IYER, N.; DAS, P.; CHAKRAVORTTY, D. Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. **Microbes and Infection**, v.12, p. 809-818, 2010.

LLEÒ, M. M.; PIEROBON, S.; CANEPARI, P. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, p. 333-339, 1998.

LLEÒ, M. D .M.; PIEROBON, S.; TAPI, M. C.; SIGNORETTO, C.; CANEPARI, P. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in laboratory microcosm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4564-4567, 2000

LUI, S.; WANG, Y. Application of AFM in microbiology: A review. **Scanning**, v. 32, p. 61-73, 2010.

LIU, Y.; GILCHRIST, A.; ZHANG, J.; LI, X. F. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water and river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1502-1507, 2008.

LIU, Y.; WANG, C.; FUNG, C.; LI, X. F. Quantification of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by targeting the *rpoS* mRNA. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 7, p. 2612-2615, 2010a.

LIU, Y.; WANG, C.; TYRRELL, G.; LI, X. F. Production of shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7, **Water Research**, v. 44, p. 711-718, 2010b.

MAGMAN, M. W.; LUCCHINI, S.; DANINO, V.; CROININ, T. O.; HINTON, J. C.; DORMAN, C. J. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 1831-1847, 2006.

MAKINO, S.; KII, T.; ASAKURA, H.; SHIRAHATA, T.; IKEDA, T.; TAKESHI, K.; ITOH, K. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5536-5539, 2000.

MANAHAN, S.; STECK, T. R. The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 29-38, 1997.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 145-156, 2000.

MASTROENI, P. e MASKELL, D. **Salmonella infections: Clinical, immunological and molecular aspects**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2006.

McDOUGALD, D.; RICE, S. A.; WEICHART, D.; KJELLEBERG, S. Nonculturability: adaptation or debilitation? **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p. 1-9, 1998.

MENDES, R. A. **Indução, perfil de proteínas intracelulares e detecção de mRNA de *Salmonella enterica* no estado viável não cultivável**. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 90 p., 2009.

MONTVILLE, T.J. Principles which Influence Microbial Growth, Survival, and Death in Foods. In: **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (eds) ASM Press, Washington D.C., USA, p. 13-29, 1997.

MORTIMER, S. O. The *Salmonella*-containing vacuole – Moving with the times. **Microbiology**, v. 11, p. 38-45, 2008.

MORTON, D.; OLIVER, J. D. Induction of carbon starvation proteins in *Vibrio vulnificus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3653-3659, 1994.

O'BYRNE, C. P.; BOOTH, I. R. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. . **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 203-216, 2002.

OCHMAN, H.; SONCINI, F. C.; SOLOMON, F.; GROIMAN, E. A. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 7800-7804, 1996.

OLIVER, J. D.; NILSSON, L.; KJELLEBERG, S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2640-2644, 1991.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. *In: Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology*, p. 723-730, 2000.

OLIVER, J. D. Viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 93-100, 2005.

OLIVER, J. D. Recent finding on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 415-425, 2010.

OLIVER, J. D.; DAGHER, M.; LINDEN, K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. **Journal of Water and Health**, v. 3, p. 249-257, 2005.

ORDAX, M.; MARCO-NOALES, E.; LÓPEZ, M. M.; BIOSCA, E. G. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3482-3488, 2006.

PAI, S. R., ACTOR, J. K., SEPULVEDA, E., HUNTER, R. L., JAGANNATH, C. Identification of viable but non-viable *Mycobacterium tuberculosis* in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA. **Microbial Pathogenesis**, v. 28, p. 335-342, 2000.

POMMEPUY, M.; BUTIN, M.; DERRIEN, A.; GOURMELON, R.; COLWELL, R.; CORMIER, M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable

*Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.12, p. 4621-4626, 1996.

RAHMAN, I.; SHAHAMAT, M.; CHOWDHURY, M. A.; COLWELL, R. R. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 115-120, 1996.

REEVES, M. W.; EVINS, G. M.; PLIKAYTIS, A. A.; HEIBA, B. D.; FARMER, J. J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 313-320, 1989.

REEZAL, A.; McNEIL, B.; ANDERSON, J. G. Effect of low osmolality nutrient media on growth and culturability of *Campylobacter* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4643-4649, 1998.

REISSBRODT, R.; RIENAECKER, I.; ROMANOVA, J. M.; FREESTONE, P. P. E.; HAIGH, R. D.; LYTE, M.; TSCHÄPE, H.; WILLIAMS, P. H. Resuscitation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.10, p. 4788-4794, 2002.

ROLLINS, M. D.; COLWELL, R. R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n.3, p. 531-538, 1986.

ROWAN, N. J. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria. *Quo Vadis?* **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 462-467, 2004.

ROSZAK, D. B.; GRIMES, D. J.; COLWELL, R. R. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. **Canadian Journal of Microbiology**, v.30, p.334-338, 1984.

RUSSELL, N. J. Functions of Lipids: Structural Roles and Membrane Functions. *In: Microbial Lipids*. Ratledge, C.; Wilkinson, S.G. (eds). Academic Press. London. p. 279-365, 1989.

RUSSELL, N. J. Cold Adaptation of Microorganisms. *In: Life at Low Temperatures. Proceedings of a Royal Society Meeting*. Royal Society, London, U.K. p. 595-609. 1990.

RUSSELL, N. J. Lipids of Halophilic and Halotolerant Microorganisms. *In: Microbiology of Extreme and Unusual Environments*. Vol. 1. **The Halophiles**. Vreeland, R.H.; Hochstein, L. (eds). CRC Press. Boca Raton, Flórida.USA. p. 163–210, 1993.

RUSSELL, N. J.; EVANS, R. I.; STEG, P. F.; HELLEMONS, J.; VERHEUL, A.; ABEE, T. Membranes as a target for stress adaptation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 255-261, 1995.

SAMPATHKUMAR, B.; KHACHATOURIANS, G.G.; KORBER, D.R. Treatment of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with sublethal concentration of trisodium phosphate or alkaline pH induces thermotolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 4613-4620, 2004.

SANTOS, D. M. S.; JUNIOR, A. B.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 39-42, 2002.

SAUX, M. F-L.; HERVIO-HEATH, D.; LOAEC, S.; COLWELL, R. R.; POMMEPUY, M. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5641-5646, 2002.

SCHOLOSSER, W.; HOGUE, A.; EBEL, E.; ROSE, B.; UMHOLTZ, R.; FERRIS, K.; JAMES, W. Analysis of *Salmonella* serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the pathogen reduction; hazard analysis and critical control point final rule in the US. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, p. 107-111, 2000.

SEELIGMANN, C. T.; MIRANDE, V.; TRACANNA, B. C.; SILVA, C. ; AULET, O.; CECILIA, M.; BINSZTEIN, N. Phytoplankton-linked viable non-culturable *Vibrio cholerae* O1 (VNC) from rivers in Tucumán, Argentina. **Journal of Plankton Research**, v. 30, n. 4, p. 367-377, 2008.

SHEA, J. E.; HENSEL, M.; GLEESON, C.; 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.

SIGNORETTO, C.; LLEÒ, M. M.; CANEPARI, P. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. **Current Microbiology**, v. 44, p. 125-131, 2002.

SIGNORETTO, C.; LLEÒ, M. M.; TAFI, M. C.; CANEPARI, P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1953-1959, 2000.

SKJERDAL, O. T.; SLETTA, H.; FLENSTAD, S. G.; JOSEFSEN, K. D.; LEVINE D. W.; ELLINGSEN T. E. Changes in cell volume, growth and respiration rate in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose and glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1009-1106, 1995.

SLAUCH, J. M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 580-583, 2011.

SMITH, B.; OLIVER, J. D. *In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1445-1451, 2006.

SMITH, S. J.; NEWTON, A. T.; HARWOOD, C. R.; BARER, M. R. Active but nonculturable cells of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium do not infect or colonize mice, **Microbiology**, v. 148, p. 2717-2726, 2002.

SUN, F.; CHEN, J.; ZHONG, L.; ZHANG, X; WANG, R.; GUO, Q.; DONG, Y. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, p. 37-44, 2008.

SWOFFORD, D. L.; WADDELL, P. J.; HUELSENBECK, J. P.; FOSTER, P. G.; LEWIS, P. O.; ROGERS, J. S. Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. **Systematic Biology**, v. 50, p. 525-539, 2001.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, n. 8, p.1596-1599, 2007.

THOMSON, N. R.; CLAYTON, D. J.; WINDHORST, D. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research**, v. 18, p. 1624-1637, 2008.

UCHIYA, K.; BARBIERI, M. A.; FUNATO, K.; SHAT, A. H. STAHL, P. D.; GROISMAN, E. A.; MASTROENI, P.; FANG, F.C.; *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking, **EMBO Journal**, v. 18, p. 3924-3933, 1999.

UCHIYA, K.; GROISMAN, E. A.; NIKAI, T. Involvement of *Salmonella* pathogenicity island 2 in the up-regulation of interleukin-10 expression in macrophages: role of protein kinase A signal pathway. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1964-1973, 2004.

VALDERRAMA, M. J.; MONTEOLIVA-SANCHEZ, M.; CORMENZANA-RAMOS, A. Influence of salt concentration on the cellular fatty acid composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. **Research in Microbiology**, v.149, p. 675-679, 1998.

VARGAS, C. KALLIMANISB, A. KOUKKOUB, A. I.; CALDERON, M. I.; CANOVAS, D.; GUERRA, F. I.; DRAINAS, C.; VENTOSA, A.; NIETO, J. J. Contribution of chemical changes in membrane lipids to the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 571-581, 2005.

VELGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, v. 36, p. 267-288, 2005.

VERNIKOS, G. S.; PARKHILL, J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. **Genome analysis**, v. 22, n. 18, p. 2196-2203, 2006.

WANG, Y. CORRIEU, G.; BÉAL, C. Fermentation pH in media containing glucose results in enhanced of *Lactobacillus acidophilus* RD758. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 21-29, 2005.

WESTER, I. H.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity island encoding type III secretion systems. **Microbes and infection**, v.3, p. 549-559, 2001.

WHITE, D. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**, 2<sup>nd</sup> edition., Oxford. University Press, New York, NY, USA, 600 p., 2000.

WHO, World Health Organization. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars**. 2007 9<sup>th</sup> ed. Disponível em: Who <[http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadreocr/salmoms/WKLM\\_2007.pdf](http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadreocr/salmoms/WKLM_2007.pdf)>. Acesso em 20 Jan. 2009.

WOOD, J. M.; BREMER, E.; CSONKA, L. N.; KRAEMER, R.; POOLMAN, B.; HEIDE, T.; SMITH, L. T. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 437-460, 2001.

YARON, S.; MATTHEWS, K. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 633-640. 2002.

YUAN, S. J.; PEHKONEN, S. O. AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by *Pseudomonas* NCIMB 2021 and *Desulfovibrio desulfuricans* in simulated seawater. **Corrosion Science**, v. 51, p. 1372-1385, 2009.

YOUSEF, A. E.; COURTNEY, P. D. Basis of Stress Adaptation and Implications in New Generation Foods. In: **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. Yousef, A.E.; Juneja, N.K. (eds) CRC Press, Washington, USA, 369 p. 2003.

XU, H. S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F. L.; ATWELL, R. W.; GRIMES, D. J.; COLWELL, R. R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microbial Ecology**, v.8, p.313-323, 1982.