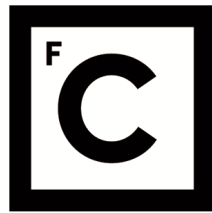


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Ciências
ULisboa**

**Virulência cooperativa em Salmonela – Simulação num
ambiente estruturado**

Diogo Miguel Henriques Veloso

Mestrado em Bioinformática e Biologia Computacional

Dissertação orientada por:
Professor Doutor Francisco Dionísio
Doutora Francisca Monteiro

Agradecimentos

- ◆ Ao Professor Doutor Francisco Dionísio por ter orientado a minha tese, e ter auxiliado em todas as fases do projeto, pela confiança depositada em mim e também por me ter aconselhado da melhor forma possível ao longo do tempo.
- ◆ À Doutora Francisca Monteiro, por ter ajudado e ter recheado este projeto com o seu conhecimento.
- ◆ Aos meus pais, por todo o apoio que me deram, não apenas neste ano, mas em toda a vida académica e pessoal. Por todo o incentivo e por terem acreditado sempre em mim. E também agradecer, por me terem proporcionado a possibilidade de estudar e com isso redigir esta tese.
- ◆ À minha namorada, Cristiana Amorim, por todo o apoio incondicional, amor e incentivo. Por estar lá em todas as horas, e por ter sido um exemplo de determinação e força para mim.

Resumo

O intestino humano é habitado por uma comunidade de microrganismos que é denominada microbiota. Esta microbiota, que está em simbiose com o hospedeiro, possui funções de auxílio no processo digestivo e de proteção contra bactérias patogênicas. Estas duas funções complementam-se uma vez que o auxílio do processo digestivo diminui a concentração de nutrientes no lúmen intestinal, o que vai dificultar a colonização por bactérias patogênicas. Este processo é denominado de resistência à colonização.

A *S. typhimurium* é uma bactéria patogênica que infeta o hospedeiro humano causando uma gastroenterite. O sucesso da colonização da *S. typhimurium* depende da expressão de vários fatores de virulência. Mais ainda, a *S. typhimurium* utiliza o processo de virulência cooperativa para estabelecer infecção. Este traduz-se na expressão de dois fenótipos, um que expressa a virulência através do sistema de secreção tipo III (TTSS) e o outro fenótipo que não expressa a virulência, mas que beneficia dos “bens-comuns” desencadeados pelo fenótipo virulento.

Esta tese de mestrado teve como objetivo o estudo *in silico*, em meio estruturado, do processo de virulência cooperativa da *S. typhimurium*. O propósito era perceber a forma como ocorre a infecção no meio estruturado, como também a interação dos antibióticos e probióticos na infecção. Desta forma, construímos dois modelos em meio estruturado. Um modelo representa o meio estruturado com inflamação global e o outro modelo representa o meio estruturado com inflamação local. Nestes dois modelos procedemos à distribuição aleatória das estirpes no sistema, isto é, dois fenótipos de *S. typhimurium*, bactérias mutantes espontâneas não virulentas e bactérias comensais. Num primeiro momento, optámos por analisar o processo de infecção da *S. typhimurium* wild-type nos dois modelos, numa fase mais avançada do estudo, procedemos à construção de programas que nos permitiram fazer uma análise da introdução de antibiótico e de probiótico. Os efeitos da introdução de probióticos numa infecção por *S. typhimurium* wild-type ainda não são conhecidos, sendo que os únicos estudos que existem são praticamente todos realizados *in vivo*. Com isto, a realização deste estudo *in silico*, possibilita estudar um sistema complexo como é a infecção por *S. typhimurium* e permite estudar a relação entre os diferentes componentes e variáveis, como por exemplo a interação entre as estirpes presentes nos diferentes meios. Deste modo, o estudo *in silico* possibilita prever o efeito do que poderá ocorrer nas experiências *in vivo*.

Os resultados obtidos assumindo que a inflamação é local foram diferentes dos obtidos quando assumimos que a inflamação é global. No meio estruturado com inflamação global, a introdução de antibiótico foi prejudicial para a recuperação da infecção por *S. typhimurium* wild-type. Todavia, no meio estruturado com inflamação local, a introdução de antibiótico foi prejudicial somente quando o antibiótico matou a totalidade das células do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e das bactérias mutantes espontâneas não virulentas. Quando introduzimos concentrações de antibiótico que não mata a totalidades das bactérias do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e das bactérias mutantes espontâneas não virulentas, a introdução de antibiótico foi benéfico para findar uma infecção por *S. typhimurium* wild-type.

Em relação ao probiótico, no meio estruturado com inflamação global, a introdução de probiótico proporcionou resultados diferentes que vão desde a total eliminação da *S. typhimurium* wild-type até à permanência da *S. typhimurium* wild-type no sistema. Porém no meio estruturado com inflamação local, a introdução de probiótico proporcionou, dentro do processo infeccioso, sempre a eliminação da *S. typhimurium* wild-type mostrando a estabilidade da introdução de probiótico. Estes resultados são importantes porque proporcionam novos conhecimentos para o tratamento da infecção por *S. typhimurium*.

Palavras-chave: virulência cooperativa; *S. typhimurium*; antibióticos; probióticos

Abstract

The human intestine is inhabited by a community of microorganisms that is called a microbiota. This microbiota, which is in symbiosis with the host, has functions to assist in the digestive process and to protect against pathogenic bacteria. These two functions complement each other since the aid of the digestive process decreases the concentration of nutrients in the intestinal lumen, which will hinder colonization by pathogenic bacteria. This process is called resistance to colonization.

S. typhimurium is a pathogenic bacterium that infects the human host causing gastroenteritis. The success of *S. typhimurium* colonization depends on the expression of several virulence factors. Furthermore, *S. typhimurium* uses the cooperative virulence process to establish infection. This translates into the expression of two phenotypes, one that expresses virulence through the type III secretion system (TTSS) and the other phenotype that does not express virulence, but that benefits from the “common goods” triggered by the virulent phenotype.

This master's thesis aimed to study *in silico*, in a structured environment, the *S. typhimurium* cooperative virulence process. The purpose was to understand how infection occurs in the structured environment, as well as the interaction of antibiotics and probiotics in the infection. In this way, we built two models in a structured environment. One model represents the structured medium with global inflammation and the other model represents the structured medium with local inflammation. In these two models we proceed to the random distribution of strains in the system, that is, two *S. typhimurium* phenotypes, spontaneous non-virulent mutant bacteria and commensal bacteria. At first, we chose to analyze the infection process of *S. typhimurium* wild-type in both models, in a more advanced phase of the study, we proceeded to the construction of programs that allowed us to make an analysis of the introduction of antibiotics and probiotics. The effects of the introduction of probiotics on an infection by *S. typhimurium* wild-type are not yet known, and the only studies that exist are practically all performed *in vivo*. With this, the realization of this study *in silico*, makes it possible to study a complex system such as infection by *S. typhimurium* and allows to study the relationship between the different components and variables, such as the interaction between the strains present in the different media. In this way, the *in silico* study makes it possible to predict the effect of what may occur in *in vivo* experiments.

The results assuming that the inflammation is local were different from those obtained when we assumed that the inflammation is global. In the structured environment with global inflammation, the introduction of antibiotics was detrimental for the recovery of the infection by *S. typhimurium* wild-type. However, in the structured environment with local inflammation, the introduction of antibiotics was harmful only when the antibiotic killed all the cells of the *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” phenotype and spontaneous non-virulent mutant bacteria. When introducing concentrations of antibiotic that does not kill all cells of the *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” phenotype and spontaneous non-virulent mutant bacteria, the introduction of antibiotic was beneficial to end a *S. typhimurium* wild-type infection.

Regarding the probiotic and assuming that the inflammation is global, results were different, between the total elimination of *S. typhimurium* wild-type and the permanence of *S. typhimurium* wild-type in the system. However, in the structured environment with local inflammation, the introduction of probiotic always provided, within the infectious process, the elimination of *S. typhimurium* wild-type showing the stability of the introduction of probiotic. These results are important because they provide new knowledge for the treatment of *S. typhimurium* infection.

Keywords: cooperative virulence; *S. typhimurium*; antibiotics; probiotics

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xiii
1. Introdução	1
1.1 Microbiota e o lúmen intestinal	1
1.2 Resistência à colonização	2
1.3 A descoberta da Salmonella e as suas características	2
1.3.1 Salmonella enterica serovar typhimurium	4
1.3.2 Fatores de virulência e virulência cooperativa presente na Salmonella typhimurium	4
1.4 Do antibiótico à resistência conferida pelos organismos patogênicos.....	6
1.5 A era dos probióticos	7
1.6 Dos modelos experimentais ao modelo computacional da infecção de S. typhimurium	7
2. Objetivos.....	10
3. Métodos.....	11
3.1 As estirpes.....	11
3.2 Os modelos computacionais	11
3.2.1 Meio estruturado com inflamação global	11
3.2.1.1 Criação da grelha	12
3.2.1.2 Taxa de morte	14
3.2.1.3 Troca entre fenótipos de S. typhimurium	16
3.2.1.4 Taxa de nascimento	18
3.2.2 Meio estruturado com inflamação local	18
3.3 Parâmetros dos modelos	19
3.4 Antibiótico	20
3.5 Probiótico.....	20
3.7 Parentesco	21
4. Resultados.....	22
4.1 Meio estruturado com inflamação global	22

4.1.1 A contribuição das bactérias mutantes espontâneas não virulentas para a recuperação no sistema das bactérias comensais	22
4.1.2 O antibiótico possibilita à <i>S. typhimurium</i> wild-type a sobrevivência e o domínio do sistema, levando à eliminação das bactérias comensais	24
4.1.3 O probiótico quando benéfico para o hospedeiro possibilita uma recuperação mais rápida de uma infecção por <i>S. typhimurium</i> wild-type.....	26
4.1.4 O antibiótico conjugado com o probiótico é benéfico para a recuperação das bactérias comensais em meio estruturado com inflamação global	30
4.2 Meio estruturado com inflamação local	31
4.2.1 A infecção por <i>S. typhimurium</i> em meio estruturado com inflamação local tem uma duração menor	31
4.2.2 A presença de antibiótico possibilitou um sistema em equilíbrio com a permanência da <i>S. typhimurium</i> wild-type e das bactérias comensais no sistema	33
4.2.3 O Probiótico como forma de findar uma infecção de <i>S. typhimurium</i> wild-type	34
4.2.4 A conjugação de antibiótico e probiótico em meio estruturado com inflamação local possibilita a não expulsão da <i>S. typhimurium</i> wild-type do sistema.....	37
4.2.5 A disposição aleatória das estirpes é importante para o desenvolvimento das colônias, como também para o desenvolvimento da infecção da <i>S. typhimurium</i> wild-type	40
5. Discussão.....	44
5.1 Diferenças entre os meios estruturados	44
5.2 A influência dos antibióticos numa infecção por <i>S. typhimurium</i> nos dois modelos em meio estruturado	45
5.2.1 Introdução de antibiótico bactericida é benéfica para findar uma infecção por <i>S. typhimurium</i> wild-type em meio estruturado com inflamação local.....	46
5.3 Os probióticos como forma de findar uma infecção por <i>S. typhimurium</i>	46
5.3.1 A introdução de probióticos intensifica a competição no meio estruturado com inflamação local.....	47
6. Conclusão.....	49
7. Bibliografia.....	50

Lista de figuras

Figura 1.1 Classificação taxonómica do género Salmonella	3
Figura 1.2 Disposição percentual dos serotipos por subespécie.....	3
Figura 1.3 Processo de invasão da <i>S. typhimurium</i> no lúmen intestinal.	5
Figura 1.4 Modelo computacional em meio líquido.....	8
Figura 3.5 HeatMap com as estirpes distribuídas.....	12
Figura 3.6 Criação do toro.....	13
Figura 3.7 Fluxograma do modelo, com todos os processos envolvidos.....	14
Figura 3.8 Fluxograma da taxa de morte.....	16
Figura 3.9 Fluxograma para a troca de <i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁺ - “ON” para <i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁻ - “OFF”.	17
Figura 3.10 Fluxograma para a troca de <i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁻ - “OFF” para <i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁺ - “ON”.	17
Figura 3.11 Fluxograma para a taxa de nascimento.	18
Figura 3.12 Raio das relações entre vizinhos.	19
Figura 4.13 Simulação num meio estruturado com inflamação global	23
Figura 4.14 Snapshoots das estirpes distribuídas na grelha às horas seleccionadas.....	24
Figura 4.15 Simulação no meio estruturado com inflamação global com introdução de antibiótico às 200 horas.	26
Figura 4.16 Extinção de <i>S. typhimurium</i> wild-type de acordo com as horas em que é introduzido o probiótico.	28
Figura 4.17 Introdução de antibiótico e probiótico.	30
Figura 4.18 Infecção por <i>S. typhimurium</i> em meio estruturado com inflamação local.....	32
Figura 4.19 Simulação em meio estruturado com inflamação local, com introdução de antibiótico às 100 horas.	33
Figura 4.20 Simulação em meio estruturado com inflamação local, com introdução de probiótico às 50 horas.	36
Figura 4.21 Simulação em meio estruturado com inflamação local com introdução de probiótico às 100 horas.	37
Figura 4.22 Simulações realizadas em que se introduziu antibiótico e probiótico às 150 horas, no meio estruturado com inflamação local.....	38
Figura 4.23 Parentesco.	40
Figura 4.24 Boxplots com os valores de parentesco para cada indivíduo de <i>S. typhimurium</i> wild-type.	40

Figura 4.25 Distribuição das estirpes no sistema nas primeiras horas.....	41
Figura 4.26 Distribuição das estirpes no sistema ao longo da simulação.	42

Lista de tabelas

Tabela 1.1 Competição existente nos modelos.....	9
Tabela 3.2 Associação das cores a cada estirpe envolvida no modelo.	12
Tabela 3.3 Parâmetros envolvidos nos modelos em meio estruturado.	20
Tabela 4.4 Quantidade populacionais da <i>S. typhimurium</i>	22
Tabela 4.5 Quantidade populacional inicial de cada estirpe e de espaços livres no modelo.	22
Tabela 4.6 Introdução de antibiótico e eliminação das bactérias comensais.	25
Tabela 4.7 Introdução de probiótico no sistema e as horas da possível eliminação da <i>S. typhimurium</i> do sistema.....	27
Tabela 4.8 Composição relativa das estirpes.	28
Tabela 4.9 Introdução do probiótico em horários específicos.	35
Tabela 4.10 Introdução de percentagens de antibiótico no sistema.	39

1. Introdução

1.1 Microbiota e o lúmen intestinal

No intestino humano vive uma comunidade de microrganismo, designada microbiota intestinal. Esta é constituída por mais de 500 espécies bacterianas, aeróbias e anaeróbias, existindo as anaeróbias em maior abundância (Lorian, 1994; Maier et al., 2014; Stecher & Hardt, 2008; Thiennimitr et al., 2012).

Quando nascemos, o nosso intestino ainda não contém quaisquer comunidades microbianas. As bactérias comensais começam gradualmente o seu processo de colonização assim que se dá o parto (Lorian, 1994; O'Hara & Shanahan, 2006), progredindo com o avanço da idade, pelo que durante este processo de colonização do intestino a composição microbiana vai crescendo e modificando (Derrien et al., 2019). Deste modo, as espécies bacterianas que são mais abundantes em estágios de vida mais recentes, com o avançar da idade do hospedeiro humano vão perdendo a sua abundância populacional sendo substituídas por outras espécies, devido à mudança na alimentação ou no estilo de vida. Outro fator também importante que pode influenciar a composição e a densidade da microbiota intestinal, é a localização geográfica dos hospedeiros humanos. Esta influência da localização geográfica, não só está dependente de fatores ambientais, mas também culturais, e a forma como estes influenciam a dieta e o estilo de vida (Derrien et al., 2019). Assim sendo, a comunidade microbiana intestinal pode sofrer alterações ao nível da densidade populacional e da abundância de espécies, causadas, por exemplo, por uma alteração na alimentação, ou também em virtude do uso de antibióticos (Aggeletopoulou et al., 2019; Derrien et al., 2019; Lorian, 1994; O'Hara & Shanahan, 2006; Oliveira et al., 2020).

A microbiota está dispersa por todo o intestino. A porção mais difícil de colonizar é o intestino delgado proximal (porção mais próxima do estômago), devido à presença de secreções da digestão, que alteram as condições do meio e destroem os nutrientes necessários para a sobrevivência das bactérias comensais (O'Hara & Shanahan, 2006). No intestino delgado distal começa a existir uma colonização em pequena escala. O intestino grosso é a porção com a maior taxa de colonização e maior quantidade populacional, consistindo num ambiente mais estável e propício para o crescimento e desenvolvimento da maior parte da microbiota, como também para a colonização por parte das bactérias patogénicas (O'Hara & Shanahan, 2006).

A microbiota que está em simbiose com o hospedeiro humano possui diversas funções, nomeadamente o auxílio no processo digestivo, a estimulação do sistema imunitário e a proteção contra bactérias patogénicas através da resistência à colonização (Maier et al., 2014; Monack, 2012; O'Hara & Shanahan, 2006; Stecher & Hardt, 2008; Winter et al., 2010). O auxílio no processo digestivo dá-se no lúmen intestinal, onde existem macronutrientes que o hospedeiro humano não teve a capacidade de digerir. Estes macronutrientes disponíveis no meio são metabolizados pelas bactérias comensais, libertando no lúmen intestinal micronutrientes que são passíveis de ser absorvidos para a corrente sanguínea do hospedeiro (Maier et al., 2014; O'Hara & Shanahan, 2006). A função de auxílio na digestão do hospedeiro humano complementa-se com a função de proteção contra bactérias patogénicas, que tentam colonizar o hospedeiro humano. Sendo assim, o processo digestivo realizado pelas bactérias comensais não só permite a reabsorção de nutrientes para a corrente sanguínea do hospedeiro, como também limitam a disponibilidade de nutrientes e de oxigénio no lúmen intestinal, o que condiciona a colonização por parte das bactérias patogénicas. Este processo denomina-se resistência à colonização (Maier et al., 2014; Stecher & Hardt, 2008).

1.2 Resistência à colonização

Como visto anteriormente, a microbiota está num processo de simbiose com o hospedeiro humano. Esta simbiose permite ao hospedeiro formar uma barreira de proteção contra bactérias patogénicas, um processo denominado de resistência à colonização (Maier et al., 2014; Stecher & Hardt, 2008). A resistência à colonização sucede através de mecanismos providenciados pelas bactérias comensais, como a redução de nutrientes, do oxigénio e do espaço livre disponível no meio (Stecher & Hardt, 2011). Por conseguinte, quando as bactérias patogénicas chegam ao local de colonização não possuem as condições necessárias para crescerem e multiplicarem-se. Porém, as bactérias comensais não restringem o crescimento de bactérias patogénicas somente através da limitação de nutrientes, mas também através da produção de agentes antimicrobianos, como as bacteriocinas, que combatem as bactérias patogénicas, levando conseqüentemente à sua eliminação do intestino (Kim et al., 2019; Müller et al., 2019). Adicionalmente, a resistência à colonização não é apenas um recurso que possibilita a proteção do hospedeiro contra bactérias patogénicas, servindo também como controlo da abundância populacional das bactérias comensais, não permitindo existir um crescimento proeminente de certas espécies (Lorian, 1994).

Por outro lado, a microbiota pode sofrer alterações que proporcionam modificações no processo de resistência à colonização, o que pode resultar no aumento da colonização por bactérias patogénicas. É neste contexto que surgem infeções despoletadas por bactérias exógenas (Lorian, 1994; O'Hara & Shanahan, 2006; Stecher & Hardt, 2011).

1.3 A descoberta da *Salmonella* e as suas características

Em 1885 Thiobald Smith e Daniel Elmer Salmon isolaram pela primeira vez uma espécie do género *Salmonella* do intestino de porcos, que provavelmente estavam contaminados com a peste suína clássica. Anos mais tarde, esta espécie foi batizada como *Salmonella*, em homenagem a Daniel Elmer Salmon (Chlebicz & Śliżewska, 2018; Eng et al., 2015; Fàbrega & Vila, 2013).

A *Salmonella* pertence à família das Enterobacteriaceae. É uma bactéria que não ultrapassa os 5 µm, gram-negativa, anaeróbia facultativa, móvel por ação de flagelos, sendo importante para se deslocar mais facilmente para os locais de colonização (Eng et al., 2015; Jajere, 2019; Maier et al., 2014). A *Salmonella* pode ser encontrada em vários reservatórios animais (aves, e outros animais de criação), não necessitando de estar a provocar-lhes uma infeção. Esta também pode vir a ser encontrada nos derivados, como ovos e leite, podendo igualmente contaminar vegetais, frutas e águas (Eng et al., 2015).

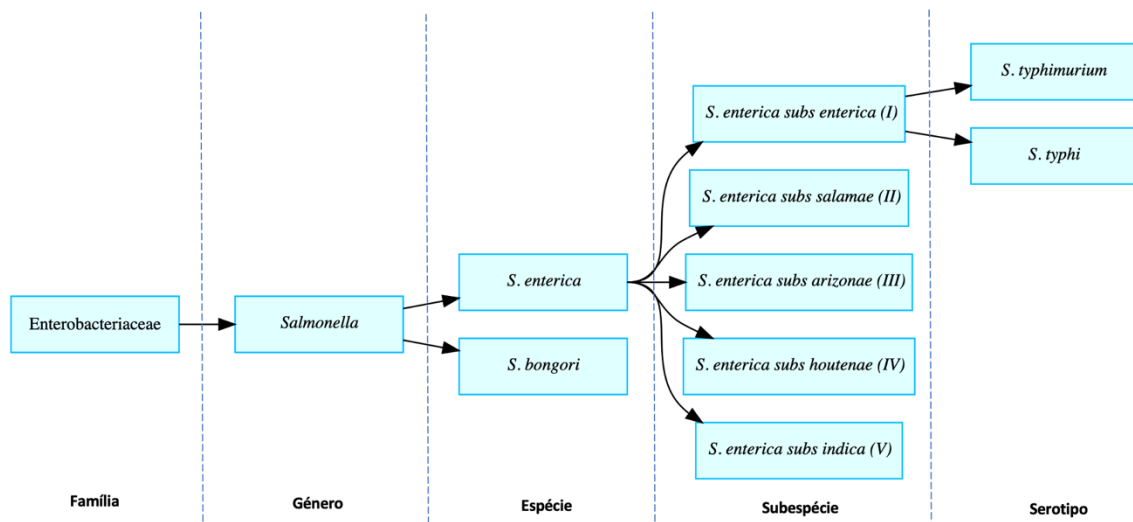


Figura 1.1 Classificação taxonômica do gênero *Salmonella* (Eng et al., 2015; Fàbrega & Vila, 2013; Jajere, 2019)

A classificação da *Salmonella* ainda não é consensual na comunidade científica. Contudo, podemos classificar de acordo com o genoma, a filogenia, ou através das características bioquímicas. Desta forma, o gênero classifica-se como *Salmonella*, e as espécies são identificadas como *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Estas espécies podem ser consequentemente divididas em 5 subespécies, sendo identificadas em numeração românica, começando no I e terminando no V (Eng et al., 2015; Fàbrega & Vila, 2013; Jajere, 2019) (Fig. 1.1). A distinção das espécies ocorre através de uma sequenciação do RNA ribossômico (rRNA) (Jajere, 2019). Através das propriedades bioquímicas e da filogenia conseguimos distinguir as subespécies, sendo a distinção dos serotipos (aproximadamente 2500 serotipos) realizada através do método de kauffman-white (Fig. 1.2). O método de kauffman-white faz uma distinção baseada nos fenótipos dos antígenos de cada subespécie, classificando de acordo com o tipo de cápsula, com a presença de flagelo ou através dos atributos dos oligossacáridos (Eng et al., 2015; Fàbrega & Vila, 2013; Jajere, 2019; Zha et al., 2019).

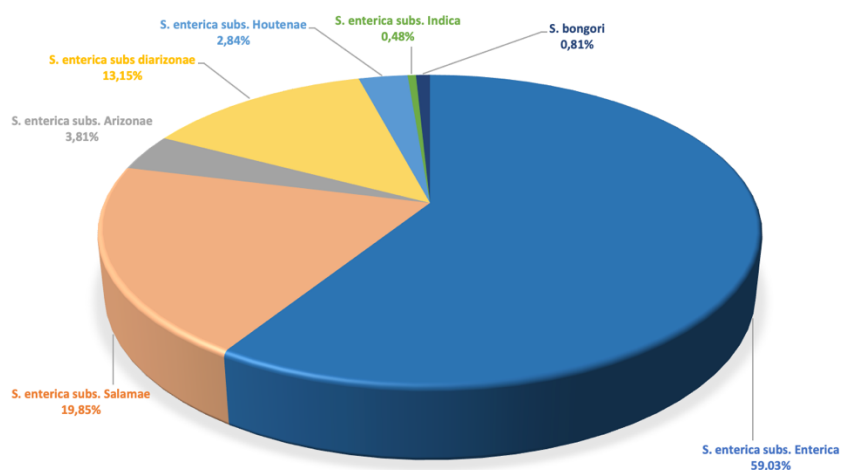


Figura 1.2 Disposição percentual dos serotipos por subespécie. A *S. enterica subs. enterica* possui a maior parte dos serotipos já identificados (Brenner et al., 2000)

A *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, descrita neste trabalho, é o principal espécie causadora de infecção em humanos (Fàbrega & Vila, 2013; Herrero-Fresno & Olsen, 2018).

1.3.1 *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*

A *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, daqui em diante apenas denominada *Salmonella typhimurium*, caracteriza-se por ser uma bactéria patogénica de origem alimentar. Esta é responsável por causar gastroenterites em humanos, cujos principais sintomas são febre, inflamação intestinal, vómitos, dor abdominal e diarreia. Todavia, em casos mais graves pode provocar infeções sistémicas e levar à morte (Eng et al., 2015; Monack, 2012; Thiennimitr et al., 2012; Zhang et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, as bactérias comensais providenciam uma barreira contra estas bactérias patogénicas, sendo que conforme o estilo de vida e o sistema imunitário, esta barreira tem diferentes resistências à colonização. Desta forma, existem grupos mais vulneráveis a terem uma infecção por *S. typhimurium*, como as crianças, os idosos e os indivíduos com o sistema imunitário debilitado (Eng et al., 2015).

A *S. typhimurium* presente em alguns reservatórios animais, como aves, porcos entre outros, mesmo em concentrações muito baixas pode invadir o hospedeiro humano e dirigir-se para o seu local de colonização. O modo de um hospedeiro humano ingerir *S. typhimurium* pode ser através do consumo de alimentos crus ou malcozidos, ou também através do contato com águas que tenham sido contaminadas por fezes de animais ou humanos que contenham *S. typhimurium*. A transmissão pode ocorrer de pessoa para pessoa, sendo este processo muito raro, e apenas identificado em regime hospitalar (Diard & Hardt, 2017; López et al., 2012; Rabsch et al., 2001; Wotzka et al., 2017).

Após a invasão do hospedeiro, e de se deslocar até ao intestino para o colonizar, possui um período de incubação de 6 a 12 horas, provocando subsequentemente uma infecção de salmonelose que dura em média 7 dias. De maneira a conseguir desencadear inflamação, provocar a infecção e sobreviver no hospedeiro humano o maior tempo possível, faz uso de vários fatores de virulência. Os fatores de virulência possibilitam à *S. typhimurium* invadir o epitélio intestinal e consequentemente a entrarem nos macrófagos, onde desencadeiam a inflamação (Chlebicz & Śliżewska, 2018; Eng et al., 2015; López et al., 2012; Monack, 2012; Thiennimitr et al., 2012; Zhang et al., 2003).

1.3.2 Fatores de virulência e virulência cooperativa presente na *Salmonella typhimurium*

As bactérias patogénicas expressam fatores de virulência, que permitem a colonização de ambientes e posteriormente produzir uma infecção no hospedeiro (Sturm et al., 2011). Os fatores de virulência são importantes para a *S. typhimurium*, uma vez que esta faz uso deles para facilitar a colonização do hospedeiro (Ohl & Miller, 2001). Os principais fatores de virulência presentes na *S. typhimurium* são o SipA, SipB, SipC e SiiE. O SipA e o SipC são responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto no momento de chegada ao local de colonização, o SiiE é encarregue da adesão ao epitélio, enquanto que o SipB é incumbido de transferir as proteínas efetoras (López et al., 2012). O SipC e o SiiE fazem parte do sistema de secreção tipo III (TTSS). O TTSS codifica para os genes que são necessários para a invasão dos tecidos intestinais, como também para a indução do desencadeamento da inflamação por parte do hospedeiro (Ohl & Miller, 2001)(Sturm et al., 2011) (Fig. 1.3).

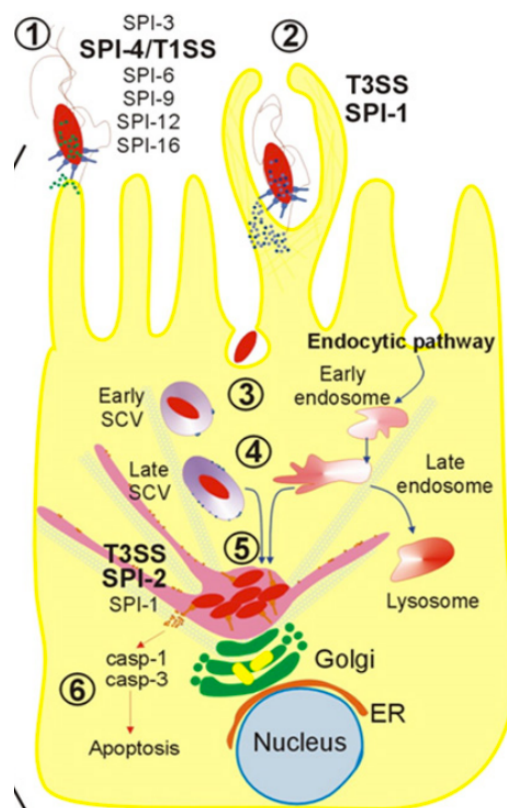


Figura 1.3 Processo de invasão da *S. typhimurium* no lúmen intestinal. A *S. typhimurium* através do T1SS incita a alterações na membrana de forma a conseguir através do T3SS libertar proteínas eefectoras dentro da membrana celular (2). De seguida a *S. typhimurium* permanece dentro de uma membrana onde amadurece (3-4). Por último ocorre o despoletar da infecção e a replicação da *S. typhimurium* (5-6). Adaptado de (López et al., 2012).

A *S. typhimurium* quando entra no hospedeiro humano, necessita de passar por diferentes ambientes até chegar ao local de colonização. Nesses ambientes depara-se com diferentes adversidades e as respostas a essas adversidades são realizadas através dos fatores de virulência (Ohl & Miller, 2001). Quando chega ao intestino a presença da microbiota dificulta a colonização e o seu crescimento. Dessa forma, a *S. typhimurium* faz uso do TTSS para conseguir superar a resistência à colonização conferida pelas bactérias comensais. A resistência à colonização é superada devido à *S. typhimurium* expressar dois fenótipos, a virulenta e a não virulenta que cooperam entre si. As bactérias com fenótipo virulento entram nas células epiteliais do intestino e, através do TTSS, desencadeiam a inflamação. A inflamação faz com que sejam libertados mais nutrientes no lúmen intestinal (“bens-comuns”), levando a um forte aumento populacional da *S. typhimurium* relativamente à microbiota (Ackermann et al., 2008; Diard et al., 2014; Thiennimitr et al., 2012). A *S. typhimurium* conforme vai crescendo e prosperando no lúmen intestinal, vai sendo eliminada para o meio ambiente através das consequências dos processos inflamatórios, contaminando e passando assim para outros reservatórios, e possivelmente outros hospedeiros (Diard et al., 2013, 2014; Tsai & Coombes, 2019) (Fig.1.3).

Durante o processo de colonização, a *S. typhimurium* apresenta dois fenótipos que cooperam entre si. Esta é uma estratégia de virulência cooperativa, que permite à *S. typhimurium* colonizar e ser bem-sucedida em ambientes adversos. Existem dois processos de virulência cooperativa, o “Bet-hedging” e o “division of labour” (em português, “divisão de tarefas”). Sendo assim, o “Bet-hedging” é a possibilidade da manifestação de diferentes fenótipos para o mesmo genótipo. Posto isto, dos fenótipos

manifestados, existe um que está mais bem-adaptado para o ambiente onde está, conseguindo desta forma superar as adversidades providenciadas por esse ambiente. Contudo, se existir alguma variação nesse ambiente, a probabilidade de sobrevivência da população como um todo é maior uma vez que existem mais fenótipos presentes, e algum desses fenótipos vai estar mais bem adaptado para essa variação (Acar et al., 2008; Ackermann, 2015; Arnoldini et al., 2014; Martins & Locke, 2015; Sturm et al., 2011). A “divisão de tarefas” permite que determinados indivíduos ou fenótipos de uma população realizem determinadas tarefas, de forma a ser menos custoso para um único indivíduo, mas vantajoso para a comunidade como um todo. Desta forma, ao dividirem tarefas, aumentam a probabilidade da sobrevivência do genótipo que é partilhado por todos (Acar et al., 2008; Ackermann, 2015; Arnoldini et al., 2014; Martins & Locke, 2015; Sturm et al., 2011).

1.4 Do antibiótico à resistência conferida pelos organismos patogénicos

Em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina, que possibilitou um advento no tratamento de infeções bacterianas até à data fatais, e deu início à era dos antibióticos (Davies, 1996; Guimarães et al., 2010; Hutchings et al., 2019).

Com o passar do tempo e devido ao uso desregulado de antibióticos, as bactérias começaram a desenvolver mecanismos de resistência a esta classe de fármacos. A resistência aos antibióticos dá-se por transmissão horizontal (plasmídeos) ou por mutações. Numa população de bactérias existem mutantes, e por casualidade pode surgir um mutante que seja resistente ao antibiótico, que vai crescer e dominar a população inicial na presença de antibiótico (Zaman et al., 2017).

Desde a segunda metade do século XX que o uso de antibióticos na agricultura e na pecuária tem aumentado drasticamente, seja para terapêutica ou até mesmo como promotor de crescimento (Rabsch et al., 2001). Com isso, os antibióticos que são fornecidos aos animais são praticamente idênticos aos utilizados na medicina. Consequentemente, o uso de antibióticos como promotor de crescimento em animais vai fazer com que as bactérias resistentes que estão presentes neles sejam passadas para os humanos através da alimentação (Zaman et al., 2017).

A *S. typhimurium* é um desses casos, sendo uma bactéria que está presente nesses animais e que pode ser transmitida aos humanos devido ao seu consumo (Eng et al., 2015). A resistência da *S. typhimurium* aos antibióticos acontece devido ao seu processo de virulência cooperativa através do TTSS, que permite à *S. typhimurium* adaptar-se da melhor forma possível ao ambiente onde está e conseguir resistir aos agentes desfavoráveis que aparecem nesses meios. Como vimos antes, a *S. typhimurium* consegue dividir-se em duas subpopulações, uma que permanece no lúmen e outra que invade os tecidos do epitélio intestinal. Desta forma, as bactérias virulentas não são afetadas pelo antibiótico uma vez que estão localizadas nos macrófagos dentro do epitélio intestinal (Diard et al., 2014). Por outras palavras, se no lúmen intestinal, o fenótipo de *S. typhimurium* não virulenta é muito sensível à presença de antibióticos, nas células epiteliais o fenótipo da *S. typhimurium* virulenta é tolerante à presença de antibiótico. Uma forma de combater essa resistência será potenciar a colonização intestinal por bactérias que não sejam patogénicas (bactérias comensais), que vão competir com a *S. typhimurium* pelos mesmos recursos. Um modo de fazer isso é recorrendo ao uso de probióticos (Diard & Hardt, 2017; O’Hara & Shanahan, 2006).

1.5 A era dos probióticos

Probiótico pode ser definido como um microrganismo ou um conjunto de diferentes microrganismos vivos que é administrado com o objetivo de restaurar a homeostase da microbiota intestinal (Chua et al., 2017; Dronkers et al., 2020; Islam, 2016; Revollo et al., 2006; Vrese, 2001).

Atualmente, a forma de utilização dos probióticos pode ser feita através do uso de suplementos dietéticos, ou do consumo de alimentos do nosso dia-a-dia, como é o caso dos iogurtes. Estes probióticos são muitas vezes encontrados em produtos lácteos fermentados (Parker et al., 2017).

Os benefícios da utilização dos probióticos são diversos. O seu uso permite auxiliar no restauro do equilíbrio da comunidade microbiana no intestino (homeostase microbiana), na diminuição da inflamação intestinal despoletada por agentes patogênicos ou por processos fisiológicos, e na redução da diarreia provocada pelo uso de antibióticos (Bai & Ouyang, 2006; Islam, 2016). De acordo com os estudos desenvolvidos nos últimos tempos, consegue-se concluir que os probióticos são importantes contra doenças do trato gastrointestinal e também no tratamento de sintomas relacionados com algumas dessas doenças, como a salmonelose e a obstipação (Parker et al., 2017).

1.6 Dos modelos experimentais ao modelo computacional da infecção de *S. typhimurium*

Como visto anteriormente, é muito relevante perceber a cooperação *in vivo* e a forma como os fenómenos de virulência cooperativa sucedem na *S. typhimurium* aquando do momento de infecção de um hospedeiro humano. Uma forma de estudar e perceber os fenómenos de virulência é através de experiências *in vivo*, *in vitro*, como também através de modelos computacionais.

Existem vários estudos do processo de infecção da *S. typhimurium* e começam a surgir novos estudos sobre a influência da virulência cooperativa no despoletar da infecção da *S. typhimurium*. Hoje sabe-se que a inflamação é crucial para permitir a colonização do intestino por parte da *S. typhimurium*. Isso deveu-se a um estudo realizado em ratinhos por (Stecher et al., 2007). (Stecher et al., 2007) percebeu que a inflamação desencadeada pelo hospedeiro permitiu uma alteração na microbiota o que facilitou a colonização por parte da *S. typhimurium*. Anos mais tarde, o trabalho desenvolvido por (Maier et al., 2014), possibilitou entender que a inflamação do intestino é necessária como também a presença de H₂ para ocorrer a colonização do intestino do hospedeiro. Contudo, descobriu-se que a *S. typhimurium* aquando do momento de colonização apresentava dois fenótipos, sendo este um processo de virulência cooperativa. Esse processo de virulência cooperativa foi estudado por (Sturm et al., 2011) e pouco tempo depois por (Diard et al., 2013). (Sturm et al., 2011) demonstrou que dos dois fenótipos de *S. typhimurium*, um tem uma taxa de crescimento maior em relação ao outro fenótipo. O fenótipo com um crescimento mais rápido está associado ao que não expressa o TTSS, enquanto que o fenótipo que expressa o TTSS apresenta uma taxa de crescimento menor. Este estudo conduziu (Diard et al., 2013) a desenvolver ensaios *in vitro* e *in silico*, onde estudou o processo de virulência cooperativa da *S. typhimurium* e também o processo de recuperação do sistema e das bactérias comensais através da presença de bactérias mutantes.

Para isso, (Diard et al., 2013) estabeleceu um sistema constituído por bactérias geneticamente virulentas, mutantes espontâneas não virulentas, e bactérias comensais (Diard et al., 2013). Estas populações caracterizam-se por:

- a) Virulentas – subpopulação de bactérias que expressam os genes de virulência (a *S. typhimurium* virulenta).
- b) Não virulentas – subpopulação de bactérias que não expressam os genes de virulência (*S. typhimurium* não virulenta).
- c) Mutantes espontâneas não virulentas – bactérias que têm os genes de virulência mutados, sendo incapazes de provocar inflamação, não tendo o custo de fitness de expressão dos genes de virulência.

Com estes modelos mostrou que a capacidade de a *S. typhimurium* invadir o hospedeiro está dependente não apenas das bactérias com fenótipo virulenta, mas também das bactérias de fenótipo não virulento, bem como das mutantes espontâneas não virulentas. As bactérias mutantes espontâneas não virulentas têm a capacidade de diminuir a virulência no hospedeiro, despoletada pela *S. typhimurium*. Embora a variação entre o estado virulenta e não virulenta dos genes de virulência realmente ajudem a manter a estirpe virulenta o tempo suficiente para poder reproduzir-se em quantidades suficientes (e eventualmente, migrar para outro hospedeiro), o espaço de parâmetros que permitem isto é muito estreito (Fig. 1.4). Fora desses valores, o sistema torna-se instável (Diard et al., 2013).

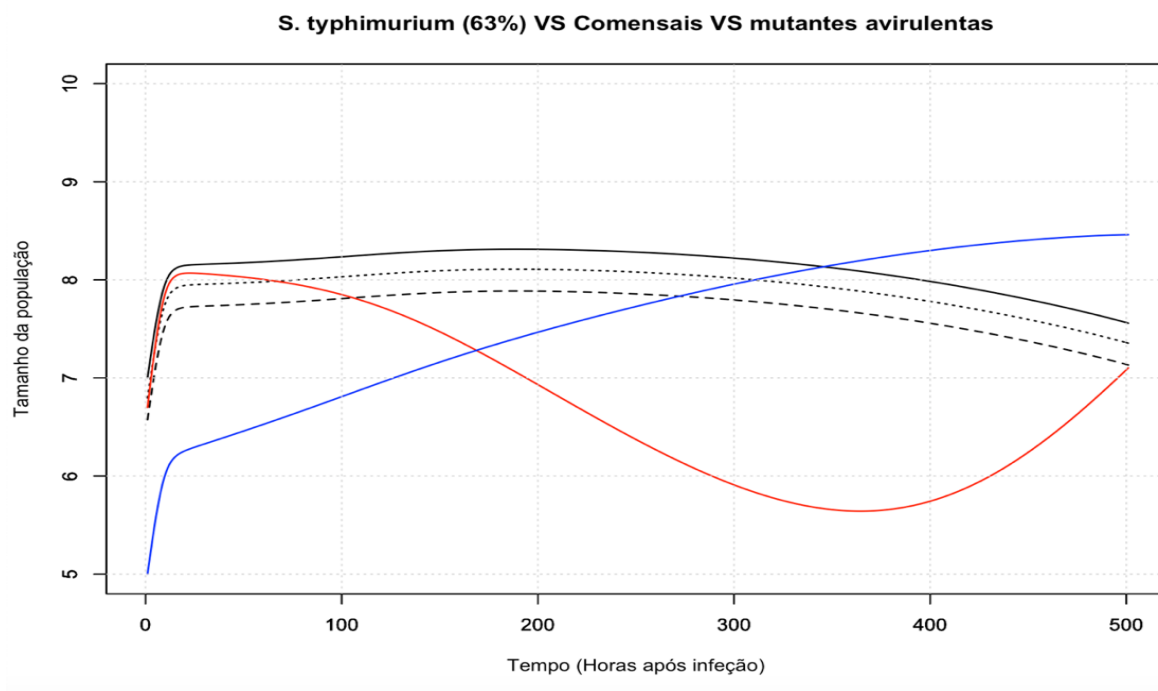


Figura 1.4 Modelo computacional em meio líquido. Simulação realizada assumindo que todas as bactérias interagem entre si, como se estivessem em meio líquido com agitação. A linha azul, representa as mutantes não virulentas, a linha vermelha representa as bactérias comensais, as linhas a tracejado e pontilhado representam os dois fenótipos de *S. typhimurium* (virulenta e não virulenta, respectivamente), e a linha preta representa a *S. typhimurium* wild-type. O eixo do x representa o tempo em horas e o eixo do y representa o tamanho da população. Os parâmetros utilizados foram: $rA = 0.9 \cdot \ln(2)/2$; $rB = \ln(2)/2$; $rC = 1.15 \cdot \ln(2)/2$; $rD = \ln(2)/2$; $d = 10^{-9}$; $c = 0.001$; $d_i = 0.13$; $d_{ic} = 0.26$; $l = 5 \cdot 10^7$; $h = 2$; $SAB = 1/30$; $SBA = 1/30$.

Com o seu modelo matemático e experimental, (Diard et al., 2013) chegou à conclusão, que a presença de *S. typhimurium* no hospedeiro é um mecanismo de manutenção de estabilidade no caso de surgirem bactérias mutantes espontâneas não virulentas. De forma a permitir a estabilidade evolutiva da

virulência, a *S. typhimurium* utiliza o fenótipo *S. typhimurium* não virulenta para crescer tão rápido quanto as mutantes e de certa forma retardar o seu crescimento acentuado (Diard et al., 2013).

O modelo matemático tinha o objetivo de modelar o que se passa no intestino de ratinhos (Fig. 1.4). No entanto, ao utilizarem equações diferenciais ordinárias, os autores assumem implicitamente que o meio onde as bactérias interagem é não estruturado, isto é, que as bactérias interagem todas umas com as outras com igual probabilidade (ou seja, como se se tratasse de um meio líquido com agitação) (Tabela 1.1). Desta forma, o modelo contemplou que a inflamação e a competição ocorriam globalmente. Por conseguinte, o objetivo desta tese de mestrado é realizar e aprofundar ainda mais este estudo in silico, considerando que a competição e a inflamação ocorrem localmente como num meio estruturado (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Competição existente nos modelos

	Competição	inflamação
Meio Líquido	Global	Global
Meio estruturado com inflamação global	Local	Global
Meio estruturado com inflamação local	Local	Local

2. Objetivos

O objetivo desta tese é estudar os fenômenos de virulência cooperativa em meio estruturado num contexto de infecção *in silico* por *S. typhimurium*. Para isso, subdividimos o trabalho em dois objetivos principais:

a) O primeiro objetivo é compreender a dinâmica e a estabilidade, em meio estruturado, da *S. typhimurium* wild-type aquando do processo de infecção no intestino humano. Isto será feito assumindo que temos quatro elementos, dois fenótipos de *S. typhimurium* (virulenta e não virulenta), as bactérias comensais e as bactérias mutantes espontâneas não virulentas, que surgem no hospedeiro devido a mutação espontânea. Estas quatro estirpes estarão em interação umas com as outras, competindo pelos nutrientes e pelo espaço livre onde vão crescer. Desta forma, será possível compreender como os quatro “tipos” de bactérias evoluem ao longo do tempo e também qual o papel que a virulência cooperativa possui num meio estruturado.

b) O segundo objetivo é o de compreender a forma como os antibióticos e os probióticos poderão influenciar o sistema, e também se a sua utilização é mais ou menos benéfica aquando de uma infecção por *S. typhimurium* wild-type, em meio estruturado.

3. Métodos

3.1 As estirpes

Nesta tese iremos simular o comportamento das estirpes de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, bactérias comensais, bem como bactérias mutantes espontâneas não virulentas.

A *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, representa a estirpe virulenta. Desta forma, vai colonizar as células epiteliais do intestino, levando a que o hospedeiro desencadeie a inflamação (Diard et al., 2013). Este processo tem associado um custo, que é representado nas simulações com uma diminuição da taxa de nascimento e um aumento da taxa de morte.

A *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, representa a estirpe não virulenta. Coloniza o lúmen intestinal, beneficiando do processo inflamatório desencadeado pela *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, mas sem contribuir para essa inflamação. Uma vez que é uma estirpe não virulenta, não tem um custo associado (Diard et al., 2013). Por conseguinte, terá uma maior taxa de nascimento e uma menor taxa de morte em comparação com a *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”.

As bactérias comensais, que estão presentes no intestino em simbiose com o hospedeiro, permitem uma maior proteção contra bactérias patogénicas que invadem o intestino do hospedeiro. Desta forma, as bactérias comensais reduzem a disponibilidade de nutrientes no meio, impossibilitando o crescimento e posteriormente a colonização (O’Hara & Shanahan, 2006). No intestino de mamíferos as bactérias comensais representam, na realidade, um conjunto muito grande (na ordem das centenas) de espécies e estirpes, embora nas simulações a sua densidade/presença seja representada por uma única variável.

As bactérias mutantes espontâneas não virulentas surgem espontaneamente no seio da população de *S. typhimurium* wild-type. Caracterizam-se por serem fenotipicamente idênticas à *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” (Diard et al., 2013).

3.2 Os modelos computacionais

Nesta tese analisámos modelos computacionais de comunidades bacterianas em meio estruturado, isto é, em que as bactérias competem por espaço de uma forma local (apenas com os seus vizinhos). Decidimos proceder à criação de dois modelos com competição local. No primeiro modelo a inflamação é global, isto é, os produtos resultantes da inflamação estão acessíveis em todo o intestino. No segundo modelo, a inflamação é local: os produtos resultantes da inflamação estão acessíveis apenas localmente, em redor de cada bactéria virulenta *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. Os modelos foram desenvolvidos na linguagem de programação R.

3.2.1 Meio estruturado com inflamação global

Um meio estruturado com inflamação global, é um meio onde cada elemento da grelha se relaciona com os seus vizinhos, mas é influenciado pela inflamação produzida globalmente. Isto é, o

crescimento bacteriano está apenas dependente dos vizinhos envolventes, enquanto a taxa de morte de cada estirpe está dependente dos vizinhos, mas também da quantidade total no sistema do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”.

3.2.1.1 Criação da grelha

O modelo representa um meio estruturado, onde as estirpes se relacionam com os vizinhos envolventes. Essas relações são feitas através de processos estocásticos, estando dependentes da taxa de nascimento, da troca de fenótipos de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” para *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e vice-versa, como também da taxa de morte.

Desta forma, o primeiro passo foi a construção de uma grelha, com um tamanho de 100X100 quadrículas. Em cada quadrícula poderá estar, no máximo, uma única célula bacteriana. Se nenhuma bactéria estiver numa dada quadrícula, dizemos que é um espaço livre. Posteriormente à criação da grelha, procedemos à elaboração de um HeatMap (Fig. 3.5), onde cada elemento corresponde a uma cor, permitindo a distinção dos elementos no sistema (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Associação das cores a cada estirpe envolvida no modelo.

Correspondência de cada elemento a uma cor	
<i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁺	Vermelho
<i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁻	Laranja
Bactérias Comensais	Azul
Mutantes espontâneos não virulentos	Verde
Espaço livre	Branco

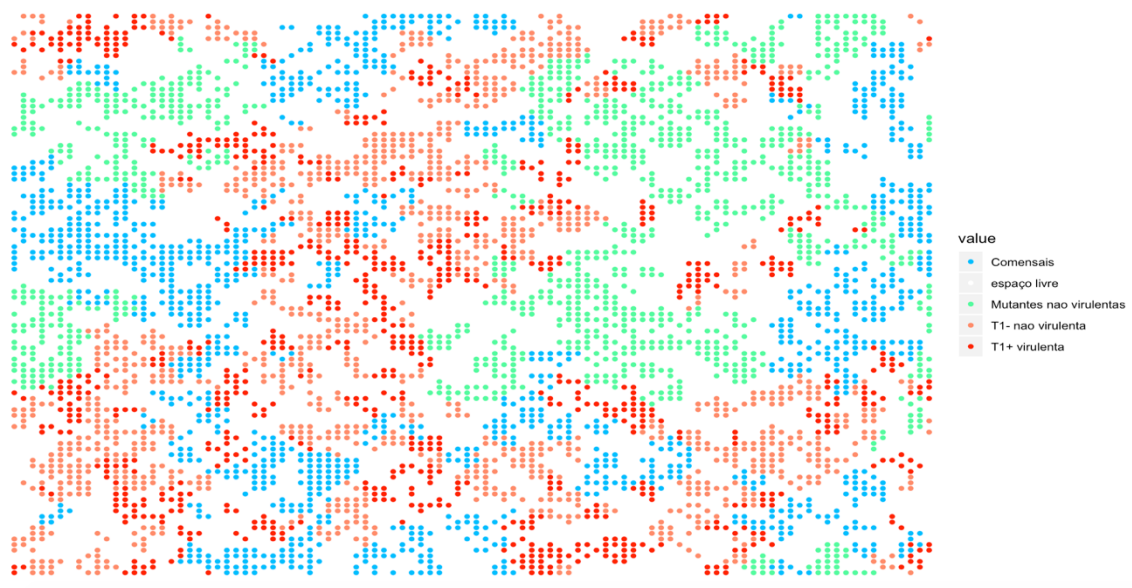


Figura 3.5 HeatMap com as estirpes distribuídas. Cada ponto representa um indivíduo, e cada indivíduo é diferenciado pela sua cor. Pontos azuis representam as bactérias comensais, os pontos verdes representam as bactérias mutantes espontâneas não virulentas, os pontos vermelhos representam a *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, e os pontos laranjas representam a *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”.

Após a construção da grelha e do HeatMap, concebemos uma função que nos permitiu evitar os efeitos de fronteira. Esta função permite que os extremos esquerdo e direito da grelha se liguem, como também o topo e a base, resultando num toro (Fig. 3.6).

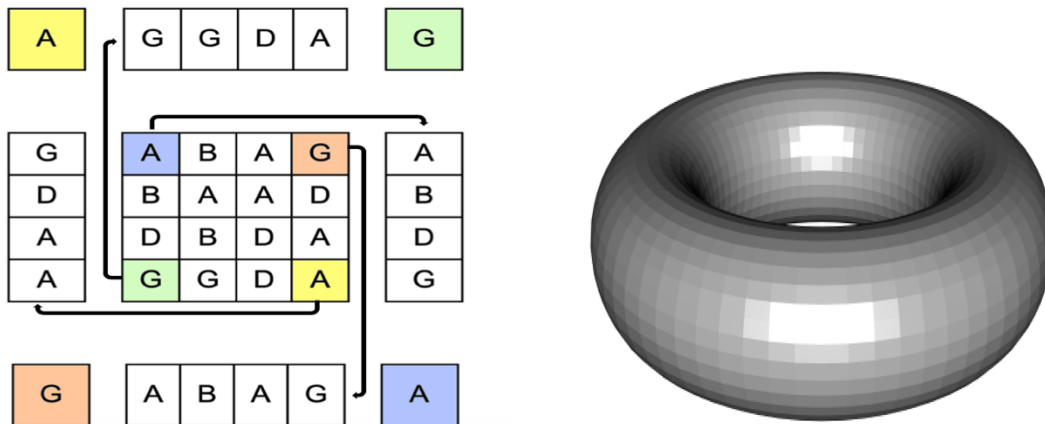


Figura 3.6 Criação do toro. Processo de criação da grelha sem fronteiras para um exemplo de uma grelha 4X4 quadrículas (16 elementos). A primeira e a última coluna vão ser colocadas nos extremos opostos, como também a primeira e última linha. Seguidamente, os vértices vão ocupar a diagonal oposta. Desta forma, cada elemento fica rodeado por oito elementos estando a matriz ligada entre si, formando um toro, como ilustrado na imagem do lado.

O modelo computacional permite definir vizinhanças de um raio r . Por exemplo, um raio $r = 1.5$ engloba os 8 vizinhos em torno de cada local. Em seguida, a termos cada elemento da grelha rodeado por vizinhos, começámos pela implementação do modelo. O modelo, como está explicito na Fig. 3.7, é um ciclo (cada ciclo representa 1 hora). Este ciclo é composto, nomeadamente, pelas taxas de nascimento e de morte, pela troca de fenótipos na *S. typhimurium* e, por último, pela criação de um HeatMap.

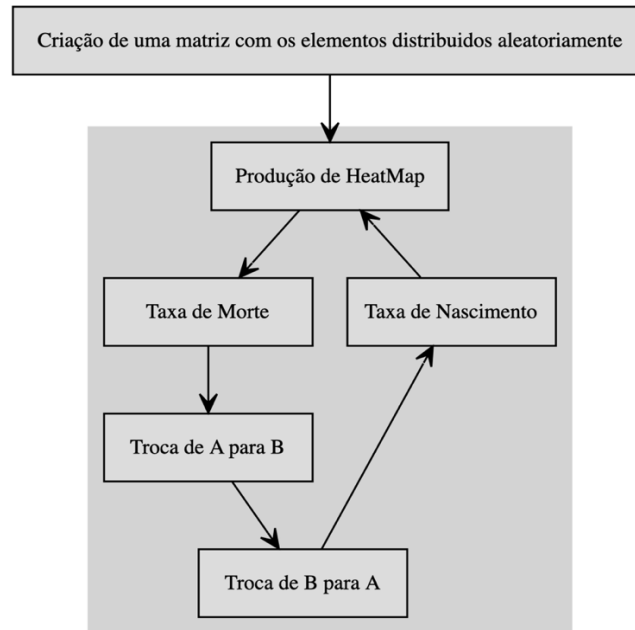


Figura 3.7 Fluxograma do modelo, com todos os processos envolvidos. A criação da grelha é o primeiro processo a ocorrer. Os processos que estão dentro do maior retângulo cinzento representam um ciclo (um ciclo corresponde a 1 hora). O primeiro processo a ocorrer é a morte das estirpes, seguido pela troca de fenótipos da *S. typhimurium*. O último processo é o nascimento de novos indivíduos e o surgimento de um HeatMap. As letras representam os elementos da grelha (A – *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, B – *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”).

3.2.1.2 Taxa de morte

A taxa de morte representa a probabilidade de que um indivíduo de uma determinada estirpe, presente numa célula da grelha, seja eliminado e dê lugar a um espaço livre.

Como está demonstrado na Fig. 3.8, a função da taxa de morte identifica para cada célula da grelha num raio de 1.5 os vizinhos envolventes e seguidamente vai reconhecer a própria célula para quem está a executar o processo. Conforme a identificação dessa célula, vai ingressar numa determinada equação (mencionadas em baixo), e proceder ao cálculo indicado por essa equação (Fig. 3.8 e equações 3.1 a 3.4). O resultado dessa equação é um valor entre zero e o valor máximo possível. Adiante, retirar-se um valor aleatório entre esses dois valores estipulados: se esse valor for menor ou igual que o resultado da equação, morre e dá lugar a um espaço livre, se for maior, sobrevive (mantém-se no sistema).

Taxa de morte da *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”,

$$T_A = d(A + B + C + D) + hill(A) \times di + c \quad \text{(Equação 3.1)}$$

Taxa de morte da *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”,

$$T_B = d(A + B + C + D) + hill(A) \times di \quad \text{(Equação 3.2)}$$

Taxa de morte das Bactérias Comensais,

$$T_C = d(A + B + C + D) + hill(A) \times dic \quad \text{(Equação 3.3)}$$

Taxa de morte das bactérias Mutantes espontâneas não virulentas,

$$T_D = d(A + B + C + D) + hill(A) \times di \quad \text{(Equação 3.4)}$$

Função de Hill,

$$hill(A) = \frac{(total\ de\ A)}{(total\ de\ A^h + K^h)} \quad \text{(Equação 3.5)}$$

A função de Hill, que aparece em todas as equações, representa a intensidade da inflamação. Dessa forma, é compreensível que a função de Hill esteja sempre dependente da *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” total no sistema em cada período de tempo, uma vez, que é esta estirpe que faz o hospedeiro desencadear a inflamação.

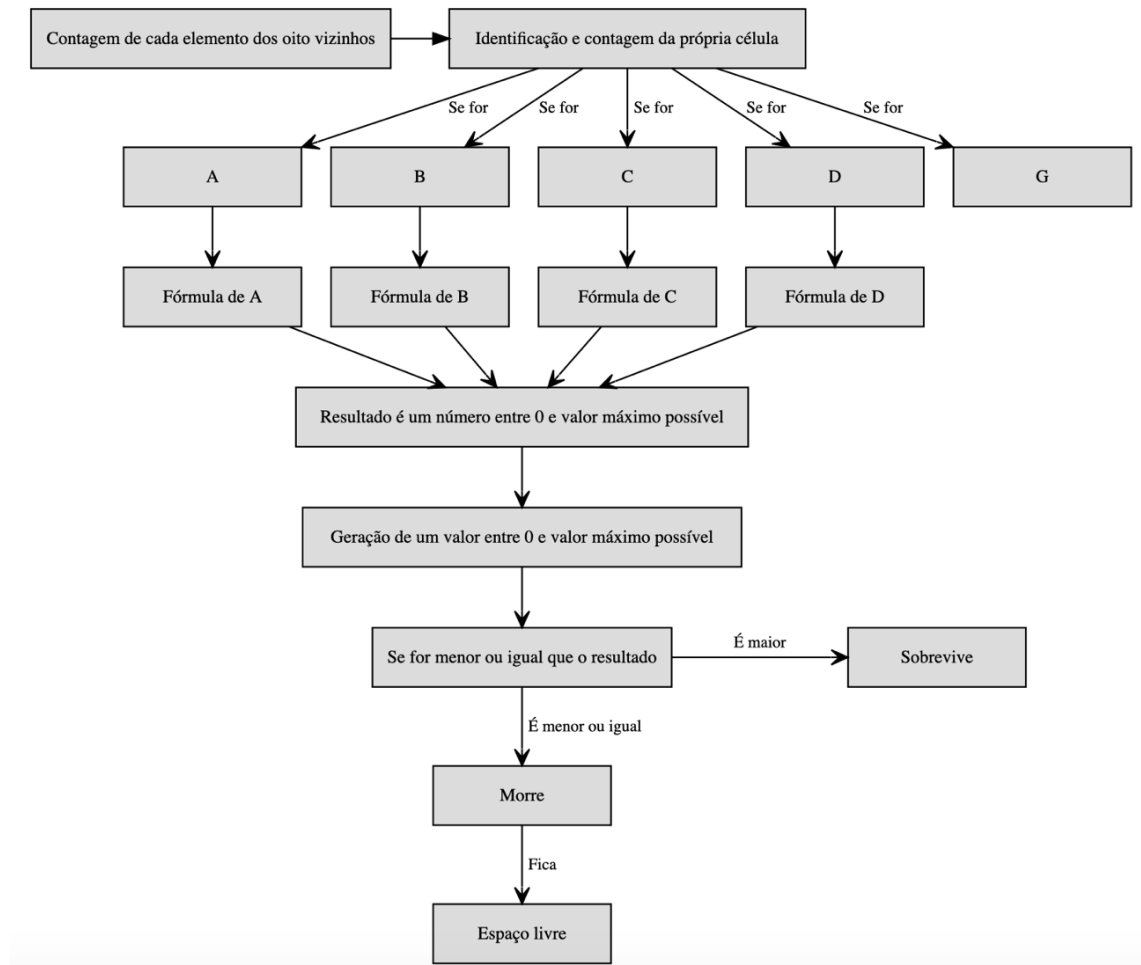


Figura 3.8 Fluxograma da taxa de morte. As letras representam cada elemento da grelha (A – *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, B – *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, C – Bactérias comensais, D – Bactérias mutantes espontâneas não virulentas, G – Espaço livre), que têm uma determinada equação para calcular o possível número de indivíduos que vão morrer (as equações estão dispostas no capítulo 3.2.1.2).

3.2.1.3 Troca entre fenótipos de *S. typhimurium*

A troca entre fenótipos é um processo de virulência cooperativa, que permite à *S. typhimurium* wild-type passar de virulenta a não virulenta ou vice-versa. Neste processo procedemos à contagem de cada indivíduo de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, identificado como A no sistema, e executámos a multiplicação com o S_{AB} (constante de troca de TTSS-1⁺ - “ON” para TTSS-1⁻ - “OFF”).

Uma vez que o resultado será sempre um valor entre zero e um, executámos de forma igual à taxa de morte. Assim sendo, é gerado um número aleatório para cada indivíduo, que supostamente pode trocar de TTSS-1⁺ - “ON” para TTSS-1⁻ - “OFF”. Desta forma, sempre que o valor for menor ou igual, troca para o fenótipo TTSS-1⁻ - “OFF”: se for maior, permanece no fenótipo TTSS-1⁺ - “ON” (Fig. 3.9).

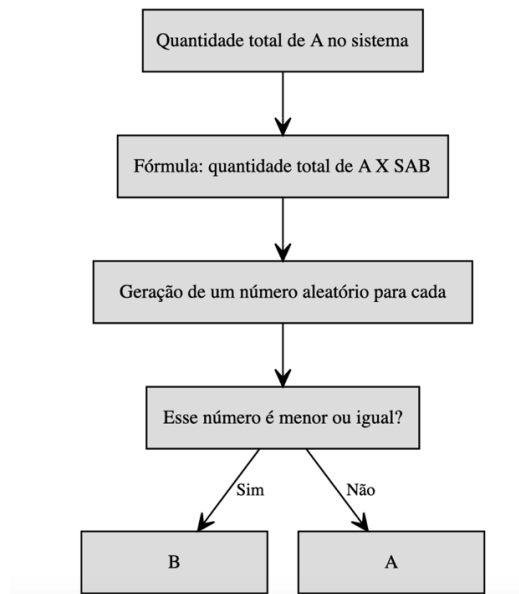


Figura 3.9 Fluxograma para a troca de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” para *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”. As letras representam cada elemento da grelha (A – *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, B – *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”). A troca do fenótipo de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” para *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” ocorre através da multiplicação da quantidade total do fenótipo de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” com a constante de troca (S_{AB}). Para cada indivíduo, a troca de fenótipo só acontece quando um número aleatório gerado é menor ou igual que o resultado dessa multiplicação.

O processo de troca de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” para *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” (Fig. 3.10) é idêntico ao processo de troca *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” para *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”.

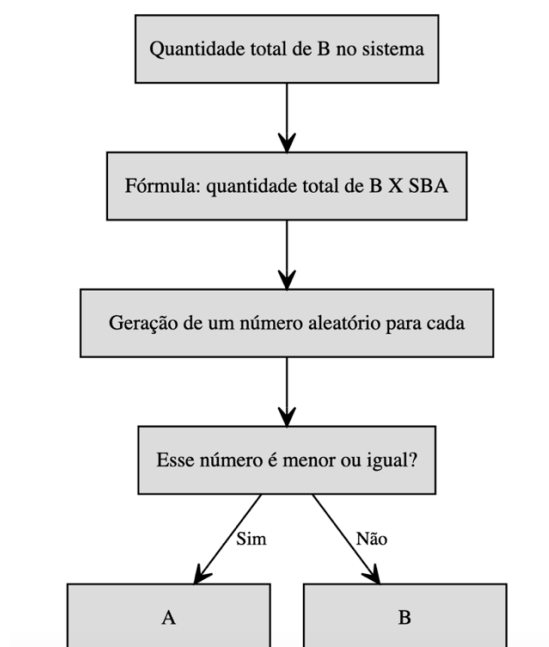


Figura 3.10 Fluxograma para a troca de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” para *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. As letras representam cada elemento da grelha (A – *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, B – *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”). A troca do fenótipo de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” para *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” ocorre através da multiplicação da quantidade total do fenótipo de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” com a constante de troca (S_{BA}). A troca de fenótipo para cada indivíduo só acontece quando a geração de um número aleatório para cada um, respectivamente, é menor ou igual que o resultado dessa multiplicação.

3.2.1.4 Taxa de nascimento

Por último, surgem novos indivíduos através da taxa de nascimento. Este processo, como se mostra na Fig.3.11, passa primeiramente pela identificação dos vizinhos num raio de estipulado para cada espaço livre. Em seguida, calcula as probabilidades de ocupação, baseando-se nos vizinhos envolventes, que têm uma determinada taxa de crescimento.

Seguidamente, e uma vez que as probabilidades vão de zero a um, procedemos à construção de um segmento que distribui essas probabilidades. Por último, geramos um valor aleatório e onde esse valor se detiver no intervalo, é esse elemento que vai surgir no sistema.

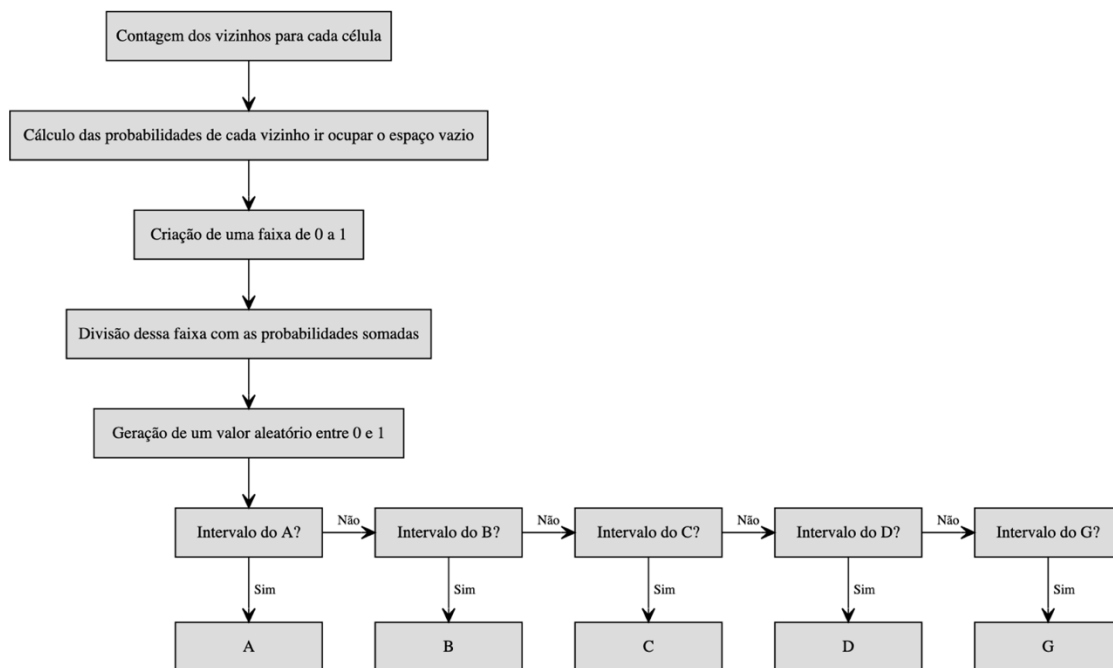


Figura 3.11 Fluxograma para a taxa de nascimento. As letras representam cada elemento da grelha (A – *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, B – *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, C – Bactérias comensais, D – bactérias mutantes espontâneas não virulentas, G – Espaço livre). O cálculo da taxa de nascimento acontece através das probabilidades de ocupação do espaço livre. Depois das probabilidades calculadas, e da construção de um segmento distribuído de 0 a 1 com as probabilidades, gera-se um valor aleatório e, onde o valor se detiver, é esse elemento que vai surgir no sistema.

3.2.2 Meio estruturado com inflamação local

Um meio estruturado com inflamação local é um meio onde cada elemento se relaciona exclusivamente com os seus vizinhos.

Desta forma, o processo é idêntico ao do modelo anterior, sendo apenas diferente na taxa de morte. Enquanto que, no meio estruturado com inflamação global a taxa de morte utiliza a inflamação produzida por todos os indivíduos presentes na grelha do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”,

neste modelo a taxa de morte utiliza apenas a inflamação produzida localmente pelo fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”.

Neste caso, as relações entre vizinhos acontecem num raio de 3.5, correspondendo a um máximo de 44 vizinhos (Fig. 3.12).

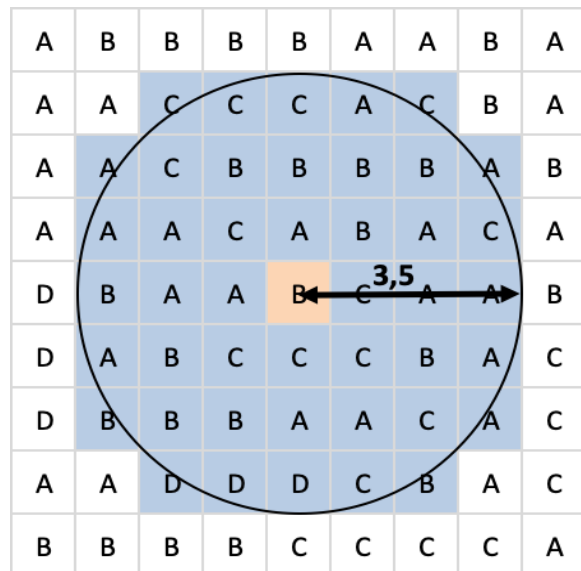


Figura 3.12 Raio das relações entre vizinhos. No modelo estruturado com inflamação local, as relações entre os vizinhos ocorrem apenas num raio de 3.5 (máximo de 44 vizinhos), sendo também a inflamação dada nesse raio.

No entanto, tivemos de proceder a alterações na forma como a inflamação influenciava a taxa de morte. No modelo estruturado com inflamação global, considerámos que *di* (clearance devido à inflamação para a *S. typhimurium*) era menor que o *dic* (clearance devido à inflamação para as bactérias comensais). Contudo, no modelo estruturado com inflamação local considerámos que o *di* teria de ser maior que o *dic*. Isto acontece, uma vez que a inflamação ao ser dada localmente, e em ordem à quantidade total do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, vai atuar em benefício da *S. typhimurium* wild-type (bens-comuns). Com isso, a intensidade da inflamação tem de ser menor para os fenótipos de *S. typhimurium* e para as bactérias mutantes espontâneas não virulentas, uma vez que estas consomem os produtos da inflamação e beneficiam deles para o seu crescimento e desenvolvimento. As bactérias comensais, por seu lado, têm de ser mais afetadas pela inflamação e ter um *dic* menor do que o *di*, uma vez que não consomem os produtos da inflamação, saindo prejudicadas (Diard et al., 2013).

3.3 Parâmetros dos modelos

Os valores dos parâmetros são baseados nos valores do artigo (Diard et al., 2013) e também na literatura. De salientar, que os parâmetros tiveram de ser reajustados para os modelos em meio estruturado, de forma a contemplarem as relações existentes com os vizinhos envolventes (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 Parâmetros envolvidos nos modelos em meio estruturado.

Parâmetros	
Parâmetros para taxa de morte	
di	Clearance devido à inflamação
dic	Clearance devido à inflamação para as Bactérias Comensais
c	Custo associado à virulência
Parâmetros para troca entre fenótipos	
SAB	Troca de <i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁺ para TTSS-1 ⁻
SBA	Troca de <i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁻ para TTSS-1 ⁺
Parâmetros para taxa de nascimento	
pa	Taxa de nascimento de <i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁺
pb	Taxa de nascimento de <i>S. typhimurium</i> TTSS-1 ⁻
pc	Taxa de nascimento das bactérias comensais
pd	Taxa de nascimento das mutantes espontâneas não virulentas
pg	Taxa de surgimento de Espaço livre

3.4 Antibiótico

O antibiótico bactericida é uma substância sintética ou natural que tem como função matar uma determinada estirpe de bactérias (Hutchings et al., 2019). Simulámos a presença de antibiótico eliminando uma certa percentagem de indivíduos do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e de indivíduos da estirpe de bactérias mutantes espontâneas não virulentas. Brevemente, o programa identifica a quantidade de bactérias do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” como também das bactérias mutantes espontâneas não virulentas e seleciona-as aleatoriamente na grelha, com uma determinada percentagem escolhida pelo utilizador. De seguida, mata essas bactérias transformando as posições ocupadas em espaço livre.

3.5 Probiótico

O probiótico é uma população de microrganismos sintética ou natural que permite restabelecer a homeostase intestinal (Dronkers et al., 2020). No modelo computacional, a adição de probiótico corresponde a um aumento populacional de bactérias comensais. Neste caso, a introdução de probiótico não está dependente da quantidade de bactérias comensais presentes no sistema, mas sim da quantidade de espaços livres. Primeiramente, identifica a quantidade de espaços livres e conforme a quantidade que o utilizador quer adicionar de probiótico, é acrescentada ao sistema bactérias comensais.

3.7 Parentesco

No meio estruturado com inflamação local cada indivíduo relaciona-se com os seus vizinhos envolventes. Desta forma, recorreremos às equações localizadas em baixo (Estrela & Brown, 2013), para identificar o parentesco nas colónias de *S. typhimurium* wild-type e perceber a forma como as colónias são formadas tendo em conta esse parentesco.

Proporção das espécies na vizinhança,

$$Seg_{AB} = \frac{(A_{viz}+B_{viz})}{9} \quad \text{(Equação 3.6)}$$

Proporção das espécies na grelha,

$$P_{AB} = \frac{(A_{total}+B_{total})}{10000} \quad \text{(Equação 3.7)}$$

Índice de segregação,

$$S = \frac{(Seg_{AB} - P_{AB})}{(1 - P_{AB})} \quad \text{(Equação 3.8)}$$

4. Resultados

4.1 Meio estruturado com inflamação global

4.1.1 A contribuição das bactérias mutantes espontâneas não virulentas para a recuperação no sistema das bactérias comensais

Em meio líquido, cada elemento relaciona-se com todos os elementos presentes no meio, enquanto que, em meio estruturado, cada elemento relaciona-se apenas com os seus vizinhos envolventes. O meio estruturado com inflamação global é um meio que não é totalmente estruturado: cada elemento compete por espaço apenas com os seus vizinhos, mas a inflamação resulta da presença de todos os indivíduos do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” presentes no meio.

Neste sistema abordámos o caso em que a quantidade populacional inicial presente no meio de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” é maior que a quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. Por conseguinte, definimos a quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” de 63% e a quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” de 37% (Tabela 4.4 e 4.5).

Tabela 4.4 Quantidade populacionais da *S. typhimurium*. Quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* wild-type, e quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* utilizada no modelo.

	Total de <i>S. typhimurium</i>	Modelo
TTSS-1 ⁺ - “ON”	37%	14.8%
TTSS-1 ⁻ - “OFF”	63%	25.2%
Wild-type	100%	40%

Tabela 4.5 Quantidade populacional inicial de cada estirpe e de espaços livres no modelo.

Quantidade populacional inicial no Modelo	
TTSS-1 ⁺ - “ON”	14.8%
TTSS-1 ⁻ - “OFF”	25.2%
Bactérias comensais	45%
Bactérias mutantes não virulentas	8%
Espaço livre	7%

Após a definição da população inicial na grelha (Tabela 4.4 e 4.5) procedemos à realização da simulação de acordo com o ciclo apresentado na secção Métodos, de forma a compreendermos a

dinâmica de uma infecção por *S. typhimurium* em meio estruturado com inflamação global. Os resultados desta simulação encontram-se ilustrados na Fig. 4.13.

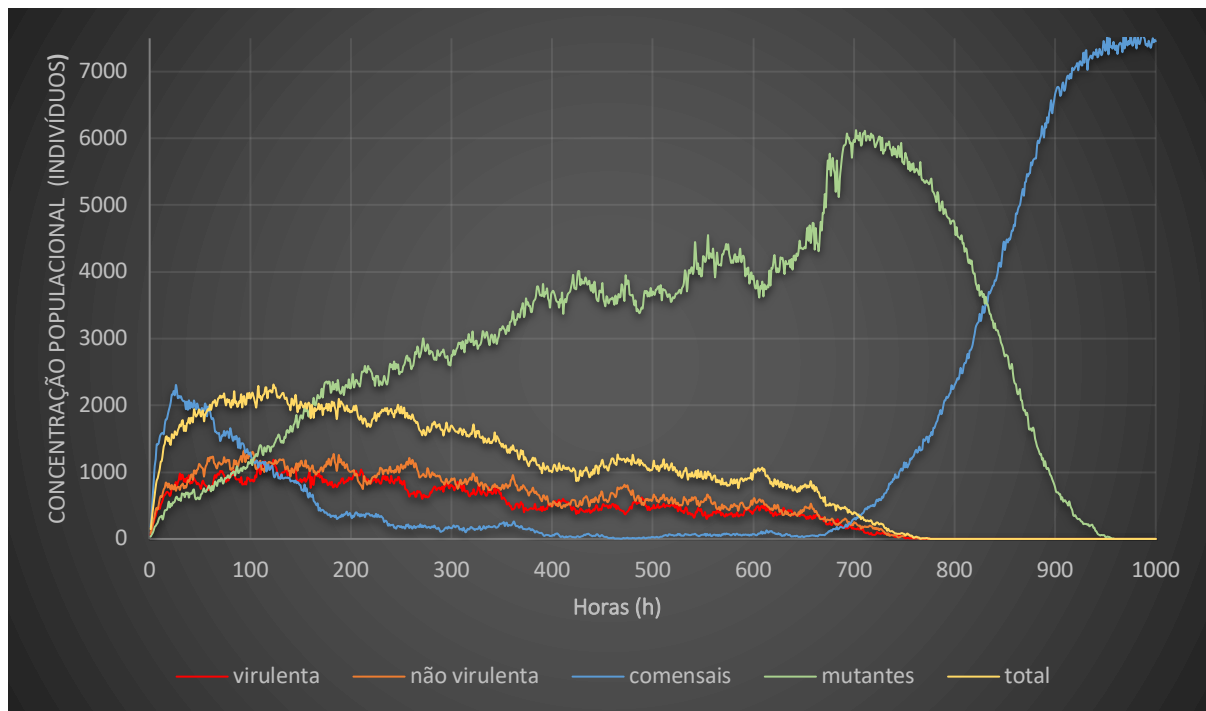


Figura 4.13 Simulação num meio estruturado com inflamação global – 63% de quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, e 37% de quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. Nesta simulação podemos ver que as bactérias mutantes espontâneas não virulentas têm sucesso enquanto as virulentas estão presentes em grande quantidade. Quando as virulentas se extinguem, deixa de haver inflamação, e as bactérias comensais conseguem recuperar e dominar o sistema. As linhas representam a quantidade populacional de cada estirpe. O eixo dos x representa o tempo em horas, e o eixo do y representa o número de indivíduos. Os parâmetros usados foram os seguintes: $d_i = 0,17$; $d_{ic} = 0,27$; $SAB = 0,22$; $SBA = 0,22$; $K = 275$; $h = 5$; $p_a = 0,9$; $p_b = 1$; $p_c = 1,15$; $p_d = 1$; $p_g = 0,2$; proporção da população (14,8; 25,2; 45; 8;7).

Na Fig. 4.13 podemos ver que as bactérias mutantes espontâneas não virulentas têm sucesso apenas enquanto as virulentas estão presentes em grande quantidade. Quando as virulentas se extinguem (perto das 750 horas), as bactérias mutantes espontâneas não virulentas deixam de poder usar os produtos da inflamação e descem rapidamente de densidade. De imediato, as bactérias comensais conseguem recuperar e dominar o sistema. Na Fig. 4.14 podemos ver o aspeto da grelha com intervalos de 200 horas: às 0 horas as estirpes são distribuídas aleatoriamente pela grelha, e conforme as horas vão passando, é possível observar a constituição de aglomerados de bactérias. Às 200 e às 600 horas, pode-se observar grandes colónias dos dois fenótipos de *S. typhimurium*, como também das bactérias mutantes espontâneas não virulentas. Nas 800 horas, já foi extinta a *S. typhimurium* wild-type e a colónia de bactérias comensais começa o seu crescimento. A competição existente entre as bactérias comensais e as bactérias mutantes espontâneas não virulentas é ganha pelas bactérias comensais, que acabam por dominar por completo o sistema.

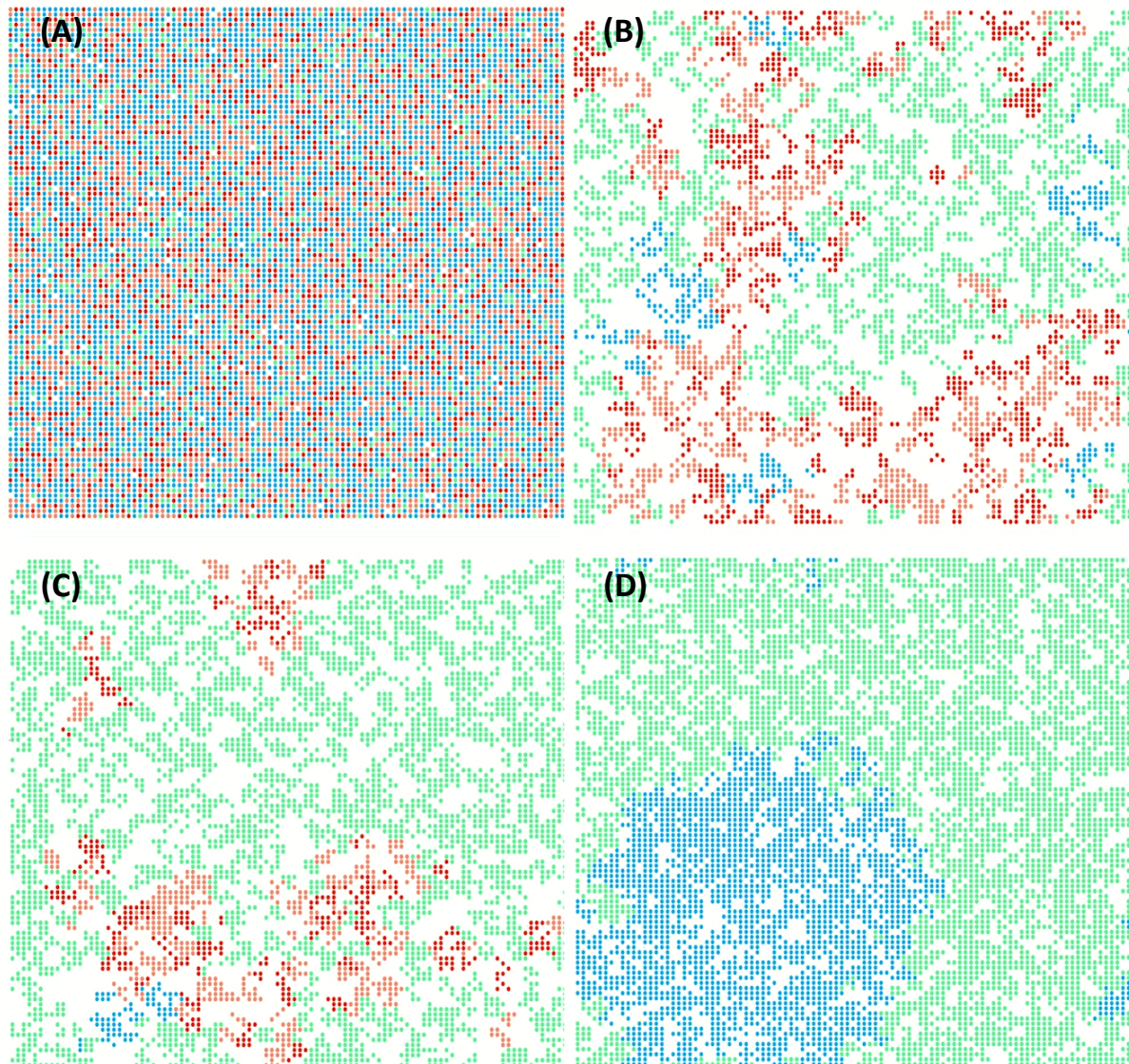


Figura 4.14 Snapshots das estirpes distribuídas na grelha às horas selecionadas. Simulação num meio estruturado com inflamação global – 63% de quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, e 37% de quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. Podemos ver o aspeto da grelha com intervalos de 200 horas: às 0 horas temos uma distribuição aleatória das estirpes e às 800 horas já só observamos bactérias comensais (pontos azuis) e bactérias mutantes espontâneas não virulentas (pontos verdes). (A) tempo - 0 horas; (B) tempo - 200 horas; (C) tempo - 600 horas; (D) tempo - 800 horas.

4.1.2 O antibiótico possibilita à *S. typhimurium* wild-type a sobrevivência e o domínio do sistema, levando à eliminação das bactérias comensais

Nesta secção analisámos o efeito no sistema da toma de antibiótico bactericida na infeção por *S. typhimurium* wild-type. Assumimos que, assim que o antibiótico está presente no sistema, mata uma certa percentagem de bactérias de cada um dos dois tipos (fenótipo de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e bactérias mutantes espontâneas não virulentas).

O antibiótico foi acrescentado ao sistema no momento em que decorria o processo infeccioso da *S. typhimurium* wild-type. Considerámos que o processo infeccioso começa quando a quantidade populacional de *S. typhimurium* wild-type supera a quantidade populacional de bactérias comensais, e

termina quando a quantidade populacional de *S. typhimurium* wild-type passa a ser menor que a quantidade populacional de bactérias comensais (Fig. 4.13).

Uma vez que o processo infeccioso ocorreu entre as 55 horas (momento em que a *S. typhimurium* wild-type tem maior quantidade populacional que as bactérias comensais) e as 719 horas (momento em que as bactérias comensais possuem maior quantidade populacional que a *S. typhimurium* wild-type) (Fig. 4.13), decidimos realizar diferentes simulações para cada hora de introdução de antibiótico estipulada. Os instantes de tempo de introdução de antibiótico foram às 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 horas. Nesta introdução de antibiótico, considerámos que o antibiótico mata 100% da população de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e de bactérias mutantes espontâneas não virulentas.

Tabela 4.6 Introdução de antibiótico e eliminação das bactérias comensais. Horas em que as bactérias comensais são eliminadas do sistema com a presença de antibiótico, quando o antibiótico é adicionado no meio estruturado com inflamação global. A introdução de antibiótico no sistema proporcionou a eliminação do sistema das bactérias comensais, devido ao antibiótico matar as bactérias mutantes espontâneas não virulentas. A quantidade populacional de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” é de 63%.

Antibiótico (horas)	Horas em que as bactérias comensais são extintas
100	452
200	428
300	729
400	530
500	526
600	926
700	1185

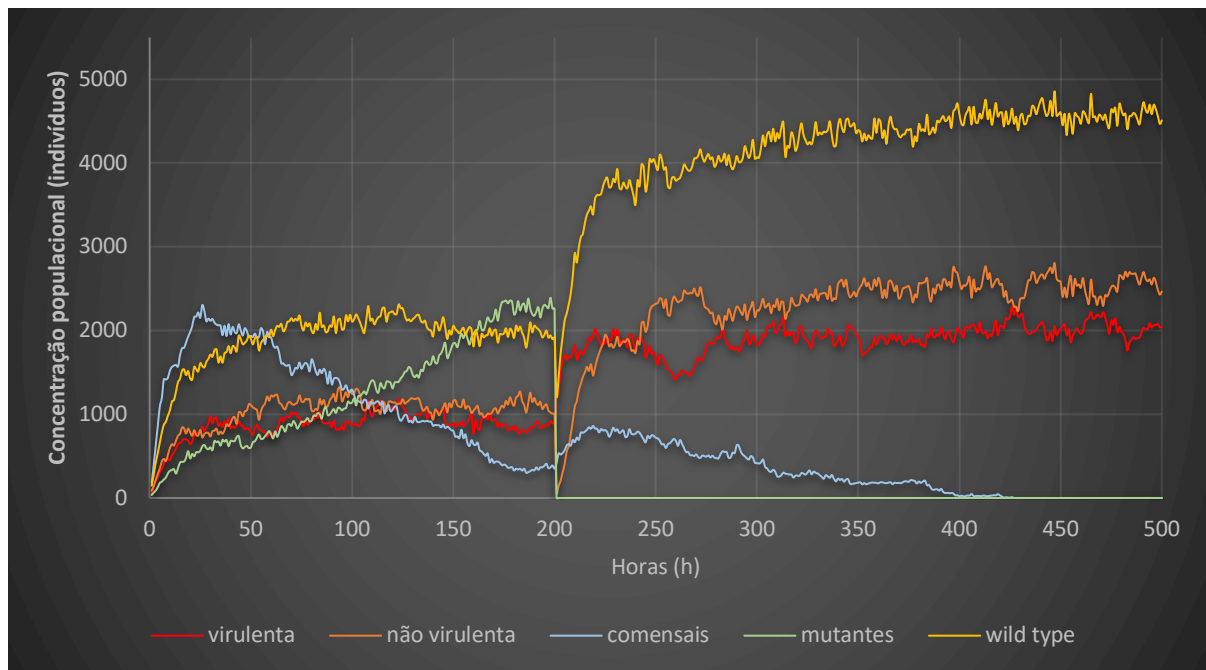


Figura 4.15 Simulação no meio estruturado com inflamação global com introdução de antibiótico às 200 horas. Simulação num meio estruturado com inflamação global – 63% de quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, e 37% de quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. Nas 200 horas foi introduzido o antibiótico no sistema, que matou a totalidade do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e de bactérias mutantes espontâneas não virulentas. A morte das bactérias mutantes espontâneas não virulentas possibilita que a virulência da *S. typhimurium* não seja reduzida, levando à morte e extinção das bactérias comensais do sistema. O eixo dos x representa o tempo em horas, e o eixo do y representa o número de indivíduos. As condições são as mesmas da Fig.4.13, mas com introdução de antibiótico às 200 horas. Os parâmetros usados foram os seguintes: $d_i = 0,17$; $d_{ic} = 0,27$; $SAB = 0,22$; $SBA = 0,22$; $K = 275$; $h = 5$; $p_a = 0,9$; $p_b = 1$; $p_c = 1,15$; $p_d = 1$; $p_g = 0,2$; proporção da população (14,8; 25,2; 45; 8;7).

Verifica-se que, para todos os casos simulados, a introdução de antibiótico levou à eliminação das bactérias comensais e, conseqüentemente, à dominância do sistema por parte da *S. typhimurium* wild-type (Tabela 4.6). Desta forma, parece ser prejudicial para o sistema a presença de antibiótico que mata a totalidade das duas estirpes (fenótipo de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ – “OFF” e das bactérias mutantes espontâneas não virulentas), pois as bactérias de *S. typhimurium* wild-type deixam de ter competição pelos nutrientes disponibilizados pela inflamação (Fig. 4.15).

4.1.3 O probiótico quando benéfico para o hospedeiro possibilita uma recuperação mais rápida de uma infecção por *S. typhimurium* wild-type

De modo a testarmos o impacto da utilização de probióticos no combate à infecção por *S. typhimurium* procedemos à criação de um modelo que possibilita a introdução de bactérias comensais no sistema. No modelo com a presença de probiótico, simulámos o efeito da introdução de bactérias comensais em todos os espaços livres da grelha e executámos as simulações às horas indicadas na tabela 4.6. Nesta tabela apresentam-se os tempos em que a *S. typhimurium* wild-type é extinta do sistema quando os probióticos são introduzidos, e a comparação com o caso em que os probióticos não são introduzidos. Na maioria dos casos a introdução de probiótico antecipou a extinção da *S. typhimurium* wild-type do sistema (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 Introdução de probiótico no sistema e as horas da possível eliminação da *S. typhimurium* do sistema. Simulações com probiótico no sistema, onde a quantidade populacional inicial de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” é de 63% e de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” é de 37%. A introdução de probióticos em todos os espaços livres levou à extinção da *S. typhimurium* wild-type do sistema na maioria dos casos. Em relação às horas em que a *S. typhimurium* wild-type é expulsa do sistema com a introdução do probiótico aconteceu antes que a extinção da *S. typhimurium* wild-type sem a introdução de probiótico.

Introdução de probiótico (horas)	<i>S. typhimurium</i>	Horas a que a <i>S. typhimurium</i> wild-type é extinta do sistema (horas)	Horas a que a <i>S. typhimurium</i> wild-type é extinta do sistema sem probiótico (horas)
100	Extinta	101	776
150	Extinta	354	
200	Sobrevive*	-	
250	Sobrevive*	-	
300	Sobrevive*	-	
350	Extinta	449	
400	Extinta	463	
450	Extinta	537	
500	Extinta	540	
550	Extinta	614	
600	Extinta	675	
650	Extinta	703	
700	Extinta	727	

* Nestes casos onde a *S. typhimurium* wild-type não foi extinta do sistema, o sistema foi dominado por completo pela *S. typhimurium* wild-type levando conseqüentemente à eliminação do sistema das bactérias comensais, não existindo uma recuperação da infecção.

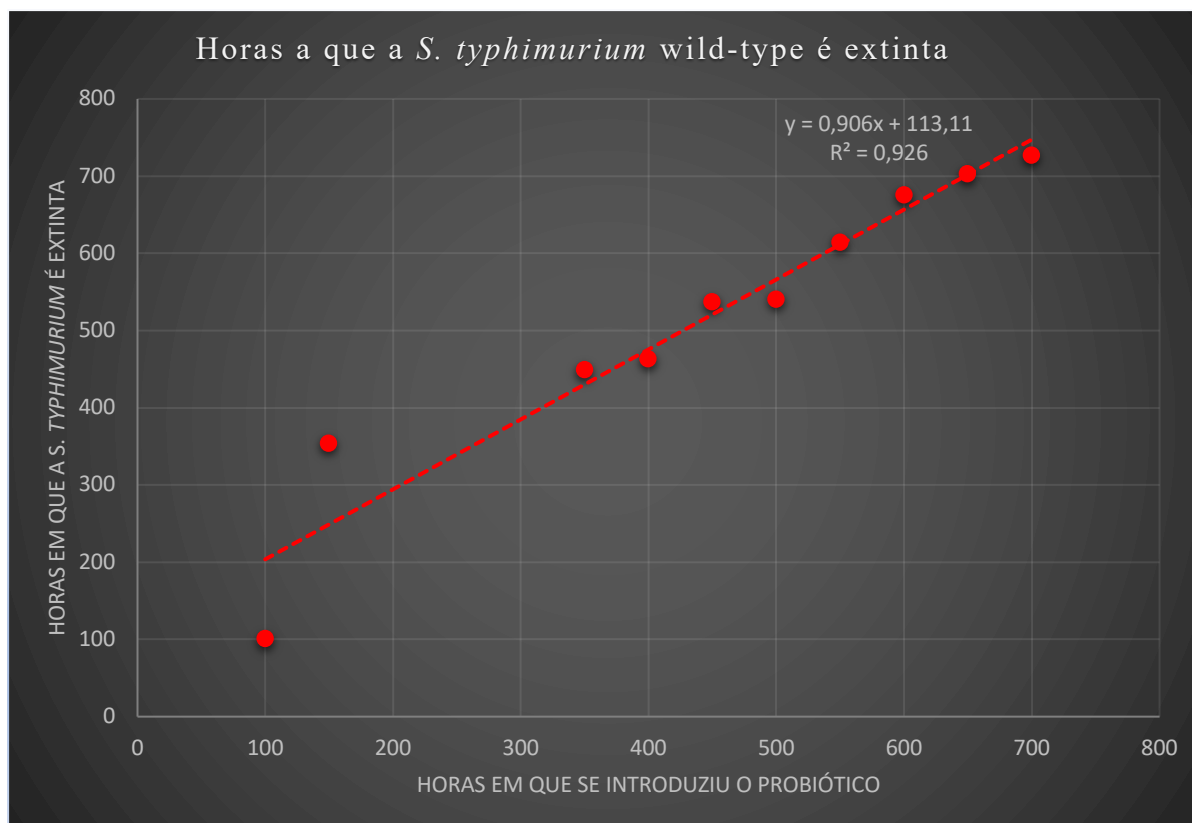


Figura 4.16 Extinção de *S. typhimurium* wild-type de acordo com as horas em que é introduzido o probiótico. Quanto mais cedo o probiótico é introduzido no sistema, mais cedo é extinta a *S. typhimurium* wild-type. O eixo dos x representa as horas a que introduzimos o probiótico, e o eixo dos y representa as horas a que a *S. typhimurium* é extinta do sistema.

Tabela 4.8 Composição relativa das estirpes. Composição relativa (%) das populações às 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 horas, no momento de introdução de probiótico. As linhas sombreadas a cinzento representam a sobrevivência no sistema da *S. typhimurium* wild-type, e as linhas em branco representam os casos em que a *S. typhimurium* wild-type foi extinta do sistema.

Hora	Total de virulentas (TTSS-1 ⁺)	Total de não virulentas (TTSS-1 ⁻)	Total de Wild-type	Total de Comensais	Total de mutantes	Total de indivíduos sem as Comensais	Diferença entre comensais e Wild-type
100	8,65%	12,42%	21,06%	67,52%	11,41%	32,48%	46,46%
200	9,09%	10,04%	19,13%	58,26%	22,61%	41,74%	39,13%
300	7,93%	9,06%	16,99%	55,52%	27,49%	44,48%	38,53%
400	5,15%	4,85%	10%	53,01%	36,99%	46,99%	43,01%
500	4,58%	6,03%	10,61%	52,33%	37,06%	47,67%	41,72%
600	4,02%	5,86%	9,88%	50,7%	39,42%	49,3%	40,82%
700	1,51%	2,49%	4%	36,2%	59,8%	63,8%	32,2%

Com base na análise da tabela 4.8, podemos compreender porque é que entre as 200 e 300 horas a *S. typhimurium* wild-type permanece no sistema. Uma vez que é um modelo estruturado com inflamação global, devemos mencionar que uma das razões é a disposição das estirpes na grelha e as relações que cada indivíduo possui com a vizinhança. Neste modelo, as interações são locais, mas o efeito da inflamação ocorre globalmente. Assim, as estirpes relacionam-se com a vizinhança envolvente, mas também vão ser influenciadas pela inflamação resultante de toda a população *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” presente na grelha.

Outra razão para a *S. typhimurium* wild-type não ser expulsa do sistema é o seu total populacional no sistema e a sua relação com as outras quantidades populacionais. A *S. typhimurium* wild-type quando permanece no sistema, a percentagem é elevada, rondando valores entre os 16% (Tabela 4.8) e os 19% (Tabela 4.8), antes da introdução do probiótico. Nestes dois casos o probiótico não foi tão eficiente. Há uma interessante exceção para este argumento, o caso em que, mesmo com 21,06% (Tabela 4.8) de *S. typhimurium* wild-type, esta população foi eliminada. Isto acontece, devido à concentração populacional de bactérias comensais. Nesse instante, as bactérias comensais representam 67,52% (Tabela 4.8) do sistema, conseguindo competir e dominar o sistema, mesmo sem a ajuda das bactérias mutantes espontâneas não virulentas, que apresentam o seu valor mínimo (11.41%) (Tabela 4.8).

Outro fator importante é a diferença populacional entre bactérias comensais e a *S. typhimurium* wild-type. Podemos ver na Tabela 4.8 que a *S. typhimurium* wild-type sobrevive e domina o sistema, quando a diferença populacional entre bactérias comensais e a *S. typhimurium* wild-type é baixa. No entanto, este critério não é absoluto estando dependente também da concentração populacional de bactérias mutantes espontâneas não virulentas. Quando a diferença populacional entre as bactérias comensais e a *S. typhimurium* wild-type apresenta valores mínimos (32,2%) (Tabela 4.8), são as bactérias comensais que dominam e não a *S. typhimurium* wild-type. Isto acontece devido à elevada concentração populacional de bactérias mutantes espontâneas não virulentas nesse momento (59,8%) (Tabela 4.8), que impossibilita o crescimento da *S. typhimurium* wild-type, e, como consequência, fazem com que as bactérias comensais voltem a recuperar no sistema.

Assim, quando queremos prever o efeito do probiótico, não devemos ter em consideração apenas a presença dos fenótipos de *S. typhimurium*, mas também relacionar com a quantidade total de bactérias comensais e com a quantidade total de bactérias mutantes espontâneas não virulentas no sistema. A razão para isto é que, se não existir uma quantidade considerável no sistema de bactérias mutantes espontâneas não virulentas ou uma quantidade grande de bactérias comensais, a *S. typhimurium* wild-type acabará por conseguir manter-se, e desta forma expulsar as bactérias comensais. Neste caso não haverá recuperação da infeção por *S. typhimurium* wild-type. É de salientar, no entanto, que a presença de probiótico foi benéfica na maior parte das horas em que foi introduzida, ajudando o sistema a recuperar mais rapidamente da infeção por *S. typhimurium* wild-type. Em todos os casos onde a *S. typhimurium* wild-type foi expulsa do sistema, as horas dessa exclusão ocorreram muito antes do que por uma recuperação natural (Tabela 4.7).

Através da Fig. 4.16, vemos que a introdução de probiótico tem uma relação direta com as horas em que a *S. typhimurium* wild-type é expulsa do sistema. Esta regressão linear tem uma equação da reta de $y = 0,906x + 113,11$ e um $R^2 = 0,926$, portanto muito perto de 1. Esta relação linear mostra que, quanto mais cedo numa infeção de *S. typhimurium* wild-type se introduzir o probiótico, mais cedo vai findar a infeção (Fig. 4.16). No entanto, é preciso ter atenção que, para se fazer esta regressão linear, ignorámos os três casos em que a *S. typhimurium* wild-type não foi eliminada. Assim, podemos correr o risco em introduzir os probióticos cedo demais, se tivéssemos em conta apenas a equação da reta.

4.1.4 O antibiótico conjugado com o probiótico é benéfico para a recuperação das bactérias comensais em meio estruturado com inflamação global

De forma a percebermos a dinâmica existente entre o antibiótico e o probiótico, no decorrer da infecção, considerámos realizar simulações com a introdução de antibiótico e probiótico. Decidimos escolher as 200 horas para realizar as simulações antibiótico versus probiótico, que corresponde a poucos dias após a infecção por *S. typhimurium* wild-type, e onde o hospedeiro já pode apresentar sintomas. Cada simulação representa a introdução de uma determinada percentagem de antibiótico e probiótico. A introdução de percentagens de antibiótico e probiótico vai desde os 0.01% até aos 100%. A percentagem de antibiótico introduzida representa a percentagem de bactérias que vão morrer, e a percentagem de probiótico introduzida representa a percentagem de bactérias comensais que vão surgir no sistema.

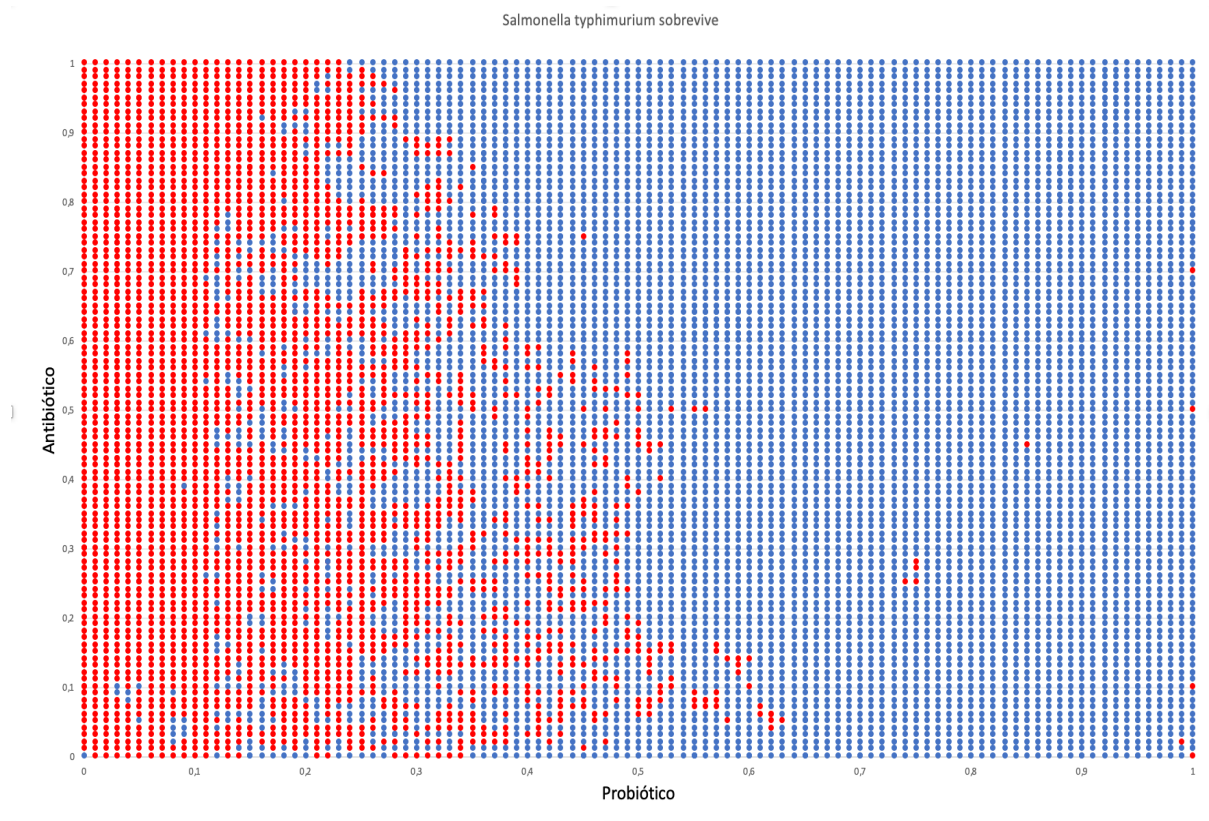


Figura 4.17 Introdução de antibiótico e probiótico. Simulações realizadas em que se introduziu antibiótico e probiótico às 200 horas. A conjugação de antibiótico e probiótico fazem com que o sistema tenha respostas diferentes de acordo com as percentagens que são introduzidas. Baixas concentrações de probiótico conjugadas com antibiótico fazem a *S. typhimurium* dominar o sistema, enquanto que percentagens altas de probiótico fazem o sistema ser dominado pelas bactérias comensais. Os pontos vermelhos representam a sobrevivência da *S. typhimurium* wild-type no sistema, os pontos azuis representam a expulsão da *S. typhimurium* wild-type do sistema. O eixo dos x representa a introdução de probiótico (percentagem de bactérias comensais adicionadas ao sistema) e o eixo dos y representa a introdução de antibiótico (percentagem de indivíduos da estirpe *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e bactérias mutantes espontâneas não virulentas que vão morrer)

Verifica-se que a introdução de antibiótico e probiótico é benéfico, na maior parte das vezes, para uma recuperação de uma infecção por *S. typhimurium* wild-type em meio estruturado com inflamação global (Fig. 4.17). Como se observa na Fig. 4.17, em mais de 50% do gráfico houve uma recuperação da infecção. Esta recuperação aconteceu maioritariamente em doses elevadas de probiótico,

não estando dependente da concentração da dose de antibiótico, uma vez que os resultados são idênticos com baixa e altas concentrações de antibiótico.

Em relação à introdução apenas de antibiótico, notamos que qualquer percentagem introduzida, faz com que o sistema seja sempre dominado pela *S. typhimurium* wild-type (Fig. 4.17). Assim, na presença de antibiótico a *S. typhimurium* wild-type beneficia sempre e domina o sistema, eliminando as bactérias comensais. Estes resultados estão em concordância com o observado aquando da introdução de antibiótico na secção 4.1.12 (Fig. 4.15).

Em relação à introdução apenas de probiótico, as conclusões diferem. Enquanto o antibiótico sozinho faz com que a *S. typhimurium* wild-type domine sempre o sistema, o probiótico sozinho por vezes consegue eliminar as bactérias patogénicas do sistema (nestes casos, as bactérias comensais dominam o sistema). Em suma, a baixas concentrações de probiótico, a *S. typhimurium* wild-type domina o sistema, mas a concentrações mais elevadas, quem domina são as bactérias comensais (Fig. 4.17).

4.2 Meio estruturado com inflamação local

4.2.1 A infeção por *S. typhimurium* em meio estruturado com inflamação local tem uma duração menor

Em meio estruturado com inflamação local, cada elemento da matriz apenas se relaciona com os seus vizinhos envolventes. Contrariamente ao caso da secção anterior, aqui a intensidade da inflamação resulta apenas da quantidade do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, presente na vizinhança e não globalmente em todo o sistema.

No meio estruturado com inflamação local cada indivíduo relaciona-se com os seus vizinhos num raio igual a 3.5, correspondendo a 44 vizinhos (Fig. 3.12). A inflamação também ocorre localmente e é distribuída num raio igual a 3.5 com o centro dessa circunferência no indivíduo do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”.

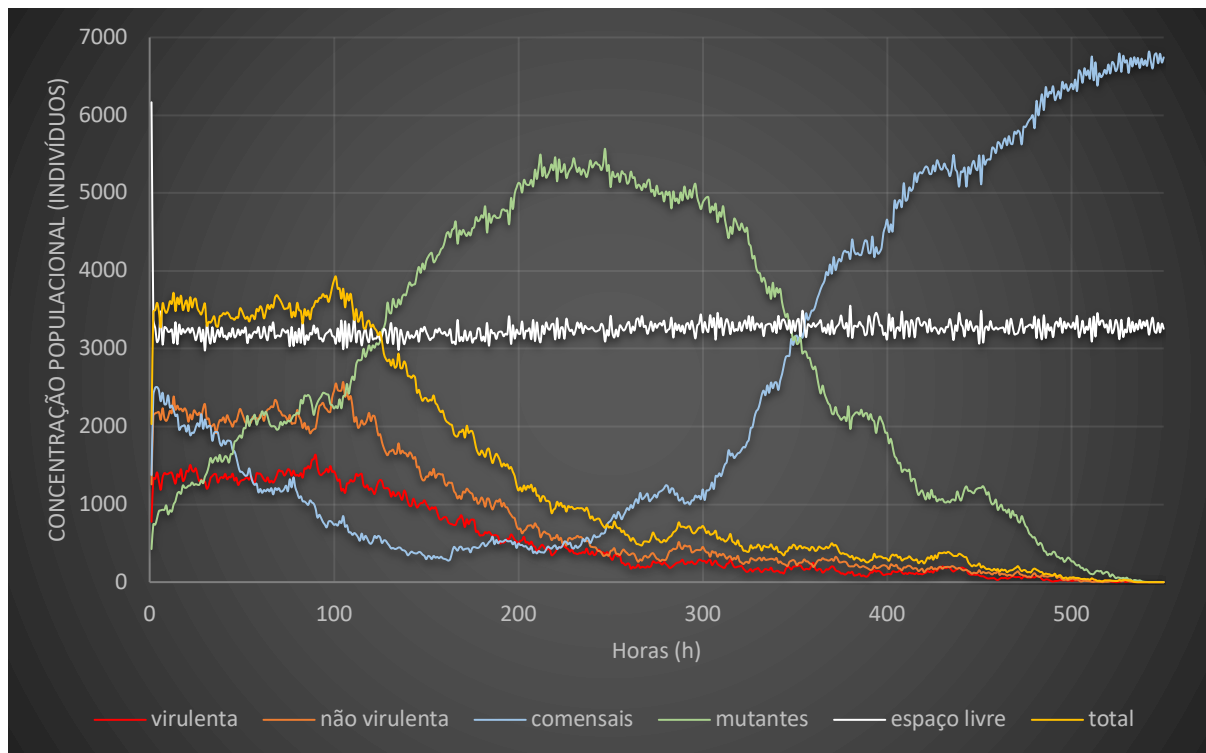


Figura 4.18 Infecção por *S. typhimurium* em meio estruturado com inflamação local. Simulação em meio estruturado com inflamação local. A infecção por *S. typhimurium* em meio estruturado com inflamação local tem uma duração menor e a recuperação das bactérias comensais é muito mais rápida. A linha apresentada a branco representa os espaços livres presentes no sistema. O eixo dos x representa o tempo em horas, e o eixo do y representa o número de indivíduos. Os parâmetros utilizados foram: $\text{di} - 0.45$, $\text{dic} - 0.05$, $\text{SAB} - 0.3$, $\text{SBA} - 0.3$, $\text{d} - 0.1$, $\text{k} - 20$, $\text{h} - 5$; população (14.8,25.2,45,8,7).

No modelo em meio estruturado com inflamação local, procedemos a simulações com as condições populacionais de 63% de *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e 37% *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. Observamos que neste caso o processo infeccioso é mais reduzido em comparação com o meio estruturado com inflamação global (Figs. 4.18 e 4.13, respectivamente), como também em meio líquido (Fig. 1.4), existindo logo a recuperação da população das bactérias comensais. Posto isto, a infecção dura cerca de 150 horas, correspondendo a uma duração por volta de 6 dias (Fig. 4.18).

Os resultados sugerem que as bactérias mutantes espontâneas não virulentas têm sucesso enquanto o fenótipo de *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” está presente em grande quantidade. Quando a *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” começa a diminuir a quantidade populacional, as bactérias mutantes espontâneas não virulentas também começam a diminuir a sua quantidade populacional (Fig. 4.18), uma vez que param de consumir os produtos da inflamação desencadeados pela *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. Esta perda da quantidade populacional das bactérias mutantes espontâneas não virulentas leva à recuperação das bactérias comensais. As bactérias mutantes espontâneas não virulentas possuem o papel mais importante entre as estirpes presentes neste modelo, uma vez que é graças a elas que a virulência da *S. typhimurium* wild-type é reduzida, providenciando a recuperação das bactérias comensais e resultando na eliminação do sistema da *S. typhimurium* wild-type. No modelo estruturado com inflamação local, podemos observar que a eliminação do sistema da *S. typhimurium* wild-type acontece muitas horas após a quantidade populacional de bactérias comensais ser maior que a quantidade populacional de *S. typhimurium* wild-type (cerca 250 horas). Estas 250 horas são devidas às relações existentes entre os vizinhos e também devido à inflamação não ocorrer globalmente, mas sim num raio de 3.5 (máximo de 44 vizinhos), levando a que as colônias de indivíduos consigam permanecer e persistir mais tempo no sistema (Fig. 4.18). Sendo assim, a inflamação local desencadeada pela *S.*

typhimurium TTSS-1⁺ - “ON” permite que as colónias de *S. typhimurium* wild-type consigam resistir mais tempo devido à presença dos “bens-comuns”, que conferem uma fonte de nutrientes e de proteção para as colónias.

4.2.2 A presença de antibiótico possibilitou um sistema em equilíbrio com a permanência da *S. typhimurium* wild-type e das bactérias comensais no sistema

Com o objetivo de perceber a dinâmica do antibiótico no meio estruturado com inflamação local, procedemos a simulações com introdução de antibiótico para cada hora estipulada. As horas selecionadas para a introdução de antibiótico foram as 50, 100, 150 e 200 horas.

Em relação à introdução de antibiótico, observámos que em meio estruturado o antibiótico faz com que o sistema seja dominado pela *S. typhimurium* wild-type (Fig. 4.19). O antibiótico, ao matar a totalidade de bactérias mutantes espontâneas não virulentas, não permite que estas ajudem a diminuir a virulência da *S. typhimurium* wild-type no sistema, o que impossibilita a recuperação das bactérias comensais. Desta forma, o sistema passou a ser dominado pela *S. typhimurium* wild-type (Fig. 4.19).

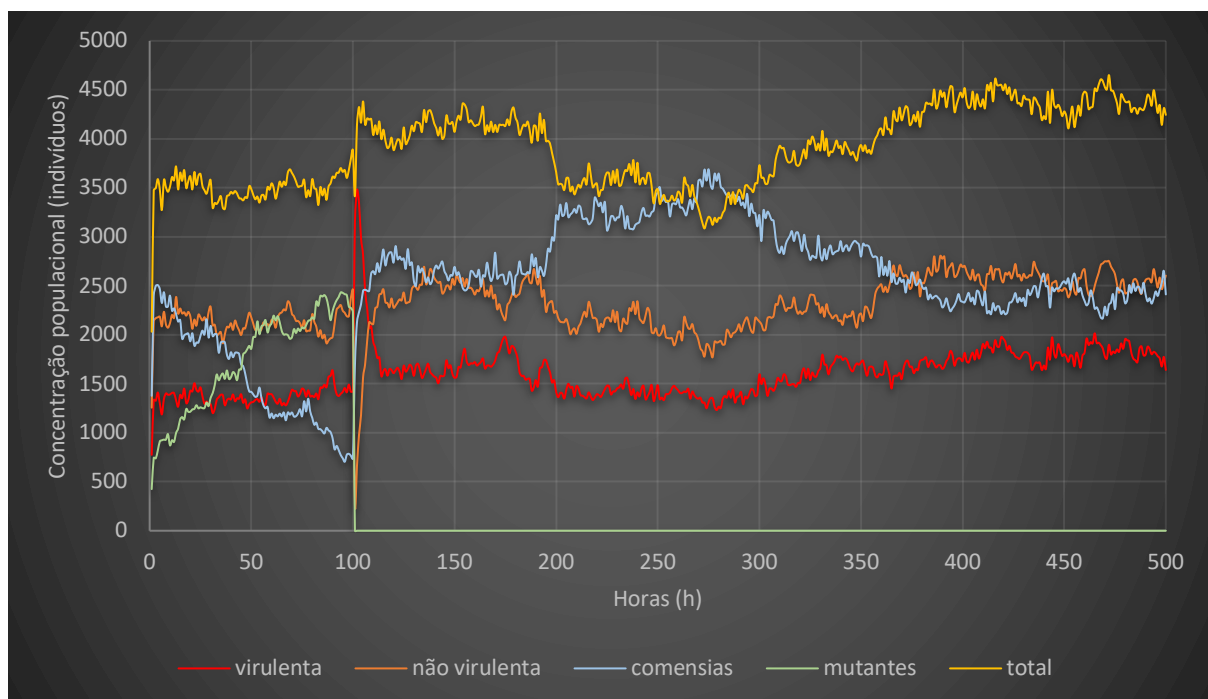


Figura 4.19 Simulação em meio estruturado com inflamação local, com introdução de antibiótico às 100 horas. A introdução de antibiótico que mata a totalidade do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e as bactérias mutantes espontâneas não virulentas, permitiu a permanência da *S. typhimurium* wild-type no sistema e a não recuperação da infecção. Com isto, o sistema ficou em equilíbrio com a presença da *S. typhimurium* wild-type e as bactérias comensais. O eixo dos x representa o tempo em horas, e o eixo do y representa o número de indivíduos.

Em nenhuma das simulações as bactérias comensais foram expulsas do sistema, apenas ficaram em concentrações mais baixas em relação à *S. typhimurium* wild-type (representada a amarelo) (Fig. 4.19). Esta situação de estabilidade populacional é demonstrada na Fig. 4.19, sendo que quem possui uma maior concentração populacional estável no sistema ao longo do tempo é sempre a *S. typhimurium*

wild-type. Assim, a introdução de antibiótico não foi benéfica para o sistema, uma vez que a *S. typhimurium* wild-type continuou a habitar o sistema.

4.2.3 O probiótico como forma de findar uma infecção de *S. typhimurium* wild-type

Com o intuito de perceber se a infecção por *S. typhimurium* wild-type em meio estruturado com inflamação local é afetada pelo probiótico, procedemos à construção de um modelo. Neste contexto, procedemos a simulações com a introdução de probiótico, onde cada simulação corresponde à introdução de probiótico a cada 10 horas desde o início até ao final do processo infeccioso.

Quando procedemos à introdução de probiótico aquando o momento de infecção por *S. typhimurium* wild-type, os resultados mostraram depender do timing da introdução (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 Introdução do probiótico em horários específicos.

Horas a que se introduziu o probiótico	Comensais dominam	<i>S. typhimurium</i> sobrevive	observação
50	Sim	Sim	Início do processo infeccioso
60	Sim	Não	Processo infeccioso
70	Sim	Não	Processo infeccioso
80	Sim	Não	Processo infeccioso
90	Sim	Não	Processo infeccioso
100	Sim	Não	Processo infeccioso
110	Sim	Não	Processo infeccioso
120	Sim	Não	Processo infeccioso
130	Sim	Não	Processo infeccioso
140	Sim	Não	Processo infeccioso
150	Sim	Não	Processo infeccioso
160	Sim	Não	Processo infeccioso
170	Sim	Não	Processo infeccioso
180	Sim	Não	Processo infeccioso
190	Sim	Não	Fim do processo infeccioso*
200	Sim	Sim	Fim do processo infeccioso*
210	Sim	Sim	Fim do processo infeccioso*
220	Sim	Sim	Fim do processo infeccioso*
230	Sim	Sim	Fim do processo infeccioso*
240	Sim	Não	Fora do processo infeccioso*
250	Sim	Sim	Fora do processo infeccioso*
260	Sim	Sim	Fora do processo infeccioso*
270	Sim	Sim	Fora do processo infeccioso*
280	Sim	Não	Fora do processo infeccioso*
290	Sim	Não	Fora do processo infeccioso*
300	Sim	Não	Fora do processo infeccioso*
350	Sim	Não	Fora do processo infeccioso*
400	Sim	Sim	Fora do processo infeccioso*
500	Sim	Sim	Fora do processo infeccioso*

* Momento em que há menos bactérias de *S. typhimurium* wild-type do que comensais.

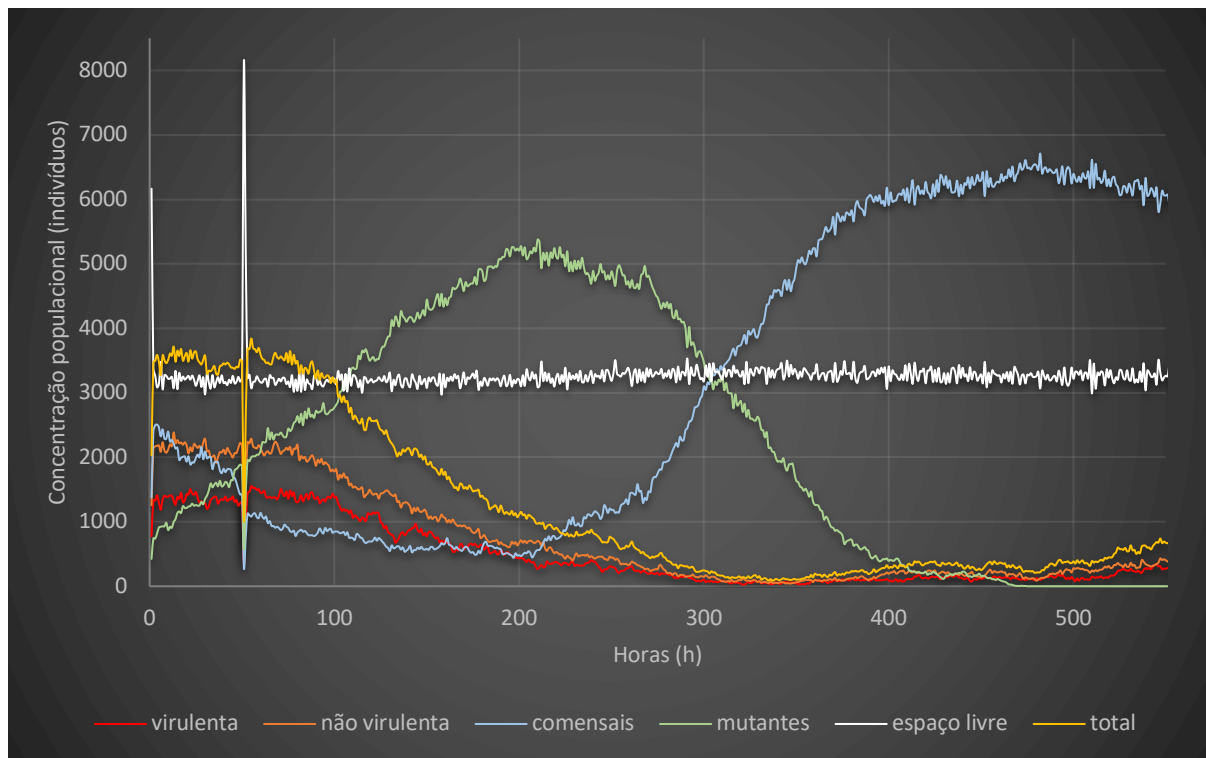


Figura 4.20 Simulação em meio estruturado com inflamação local, com introdução de probiótico às 50 horas. A introdução de probiótico às 50 horas correspondeu a introdução fora do processo infeccioso. Como podemos ver às 500 horas, as bactérias mutantes espontâneas não virulentas são eliminadas do sistema, e nesse instante a quantidade populacional de *S. typhimurium* wild-type aumentou. No entanto, mesmo tendo sido extintas as bactérias mutantes espontâneas não virulentas, o sistema continuou a ser dominado pelas bactérias comensais. Contudo, a *S. typhimurium* wild-type, permaneceu em baixas concentrações. O eixo dos x representa o tempo em horas, e o eixo do y representa o número de indivíduos.

Quando introduzimos o probiótico no início do processo infeccioso (às 50 horas) e no fim do processo infeccioso (às 200 horas), o sistema foi dominado pelas bactérias comensais, existindo uma recuperação da infecção por *S. typhimurium* wild-type, sem que a *S. typhimurium* wild-type fosse extinta do sistema (Tabela 4.9 e fig. 4.20). Neste caso, as bactérias comensais dominaram o sistema, e a *S. typhimurium* wild-type continuou presente em concentrações baixas (Fig. 4.20). Esta permanência no sistema pode dever-se ao facto de as bactérias mutantes espontâneas não virulentas terem sido expulsas, não competindo pelos nutrientes oriundos da inflamação. Assim, no início do processo infeccioso, a concentração populacional de *S. typhimurium* wild-type é elevada, e a concentração populacional de bactérias mutantes espontâneas não virulentas ainda é baixa, possuindo uma concentração idêntica às bactérias comensais. Estas diferenças populacionais fazem com que a introdução de probiótico seja prejudicial para uma recuperação por parte das bactérias comensais. No fim do processo infeccioso, o sistema também é dominado pela *S. typhimurium* wild-type (Fig. 4.20). Isto acontece, uma vez que a concentração populacional de *S. typhimurium* wild-type é baixa, e a concentração de bactérias mutantes espontâneas não virulentas é elevada, e com a introdução de probiótico, vai proporcionar a competição por espaço e nutrientes com as bactérias comensais. Esta competição possibilita uma diminuição populacional das bactérias comensais e das bactérias mutantes espontâneas não virulentas, proporcionando uma oportunidade para o crescimento da *S. typhimurium* wild-type (Fig. 4.20). Contudo, quando introduzimos o probiótico no processo infeccioso, as bactérias comensais dominaram numa elevada concentração populacional e os fenótipos da *S. typhimurium* acabaram por serem expulsos do sistema. Desta forma, pode-se considerar que a eliminação da *S. typhimurium* wild-type do sistema aconteceu devido à presença das bactérias mutantes espontâneas não virulentas (Fig. 4.21).

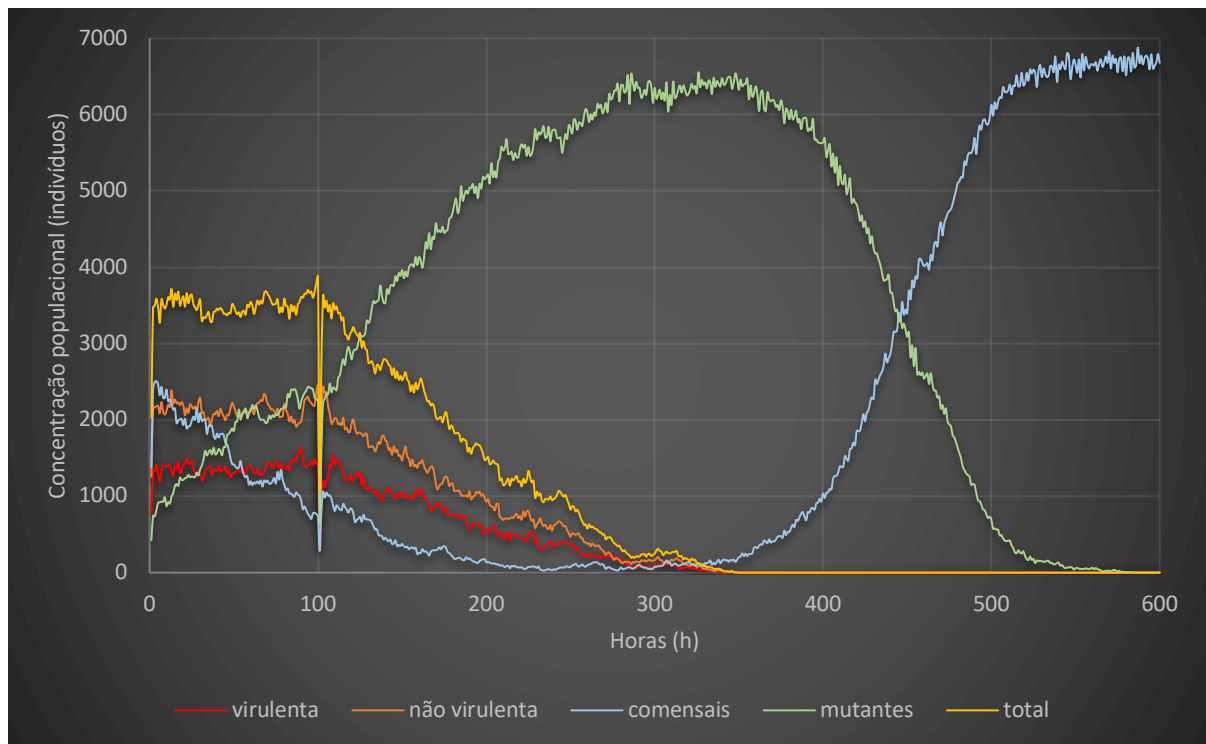


Figura 4.21 Simulação em meio estruturado com inflamação local com introdução de probiótico às 100 horas. Quando se introduziu o probiótico dentro do processo infeccioso, o sistema foi dominado pelas bactérias comensais, e a *S. typhimurium* wild-type foi extinta do sistema, devido às bactérias mutantes espontâneas não virulentas reduzirem a virulência da *S. typhimurium* wild-type. O eixo dos x representa o tempo em horas, e o eixo do y representa o número de indivíduos.

4.2.4 A conjugação de antibiótico e probiótico em meio estruturado com inflamação local possibilita a não expulsão da *S. typhimurium* wild-type do sistema

O antibiótico conjugado com o probiótico permite perceber a forma como as estirpes se relacionam e como pode ser importante para a recuperação ou não do sistema aquando de uma infeção. Desta forma, escolhemos o instante de tempo das 150 horas para realizar as simulações antibiótico versus probiótico, que corresponde a poucos dias após a infeção por *S. typhimurium* wild-type. Procedemos a simulações onde introduzimos antibiótico e probiótico às 150 horas. Introduzimos percentagens de antibiótico e probiótico que vão numa escala de 0.01% a 100%.

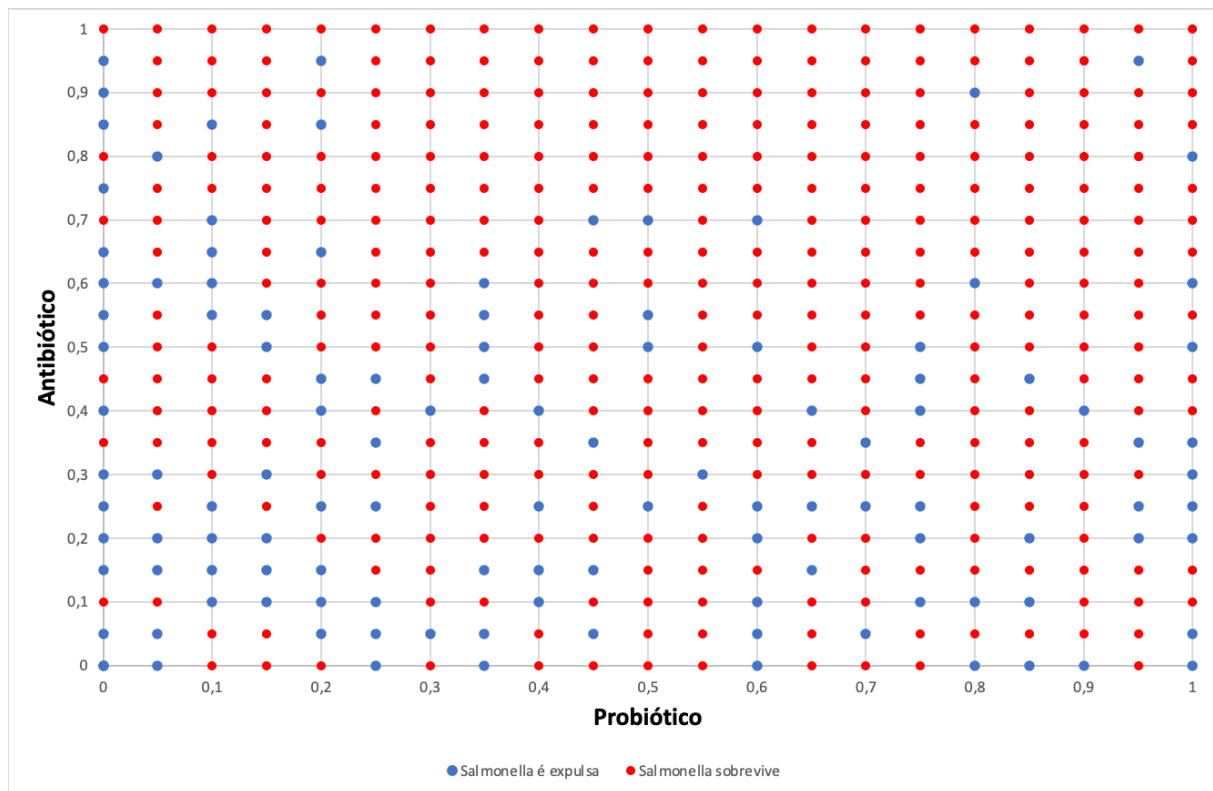


Figura 4.22 Simulações realizadas em que se introduziu antibiótico e probiótico às 150 horas, no meio estruturado com inflamação local. O eixo do X representa a introdução de probiótico que acrescenta uma determinada percentagem de bactérias comensais. O eixo do Y representa a introdução de antibiótico que mata uma determinada percentagem do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e das bactérias mutantes espontâneas não virulentas. Os pontos vermelhos representam a sobrevivência da *S. typhimurium* wild-type no sistema, os pontos azuis representam a expulsão da *S. typhimurium* wild-type do sistema. O eixo dos x representa a introdução de probiótico (percentagem de bactérias comensais adicionadas ao sistema) e o eixo dos y representa a introdução de antibiótico (percentagem de indivíduos da estirpe *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e bactérias mutantes espontâneas não virulentas que vão morrer)

Na Fig. 4.22, os pontos vermelhos representam o caso em que a *S. typhimurium* wild-type permanece no sistema, com ou sem a eliminação das bactérias comensais, já os pontos azuis representam a recuperação das bactérias comensais e a eliminação do sistema da *S. typhimurium* wild-type. Os resultados sugerem que a introdução de antibiótico e de probiótico em simultâneo é maioritariamente prejudicial para a recuperação de infeção por *S. typhimurium* wild-type. Ao introduzir o antibiótico e o probiótico em simultâneo, o probiótico (bactérias comensais) ocupa os espaços livres dentro das colónias ou em redor das colónias das bactérias mutantes espontâneas não virulentas e da *S. typhimurium* wild-type, levando à competição e deste modo à possibilidade da permanência da *S. typhimurium* wild-type no sistema.

A introdução apenas de antibiótico provocou a extinção da *S. typhimurium* wild-type na maioria dos casos testados, devendo isso ao antibiótico não eliminar a totalidade das bactérias mutantes espontâneas não virulentas (Fig. 4.22) (Tabela 4.10). No entanto, na maior parte das vezes em que a *S. typhimurium* wild-type sobreviveu no sistema, correspondeu à eliminação do sistema das bactérias comensais, levando conseqüentemente a uma não recuperação de uma infeção por *S. typhimurium* wild-type. Na introdução apenas de probiótico, os resultados vão oscilando entre a eliminação do sistema da *S. typhimurium* wild-type e a sua permanência (Fig. 4.22).

Tabela 4.10 Introdução de percentagens de antibiótico no sistema. A percentagem representa a quantidade populacional que morre do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e das bactérias mutantes espontâneas não virulentas. A introdução do antibiótico na maior parte das vezes resulta na extinção da *S. typhimurium* wild-type do sistema.

Percentagem de antibiótico	<i>S. typhimurium</i>	Bactérias comensais
0%	Extinta	Sobrevivem
5%	Extinta	Sobrevivem
10%	Sobrevive	extintas
15%	Extinta	Sobrevivem
20%	Extinta	Sobrevivem
25%	Extinta	Sobrevivem
30%	Extinta	Sobrevivem
35%	Sobrevive	extintas
40%	Extinta	Sobrevivem
45%	Sobrevive	Sobrevivem
50%	Extinta	Sobrevivem
55%	Extinta	Sobrevivem
60%	Extinta	Sobrevivem
65%	Extinta	Sobrevivem
70%	Sobrevive	Sobrevivem
75%	Extinta	Sobrevivem
80%	Sobrevive	extintas
85%	Extinta	Sobrevivem
90%	Extinta	Sobrevivem
95%	Extinta	Sobrevivem
100%	Sobrevive	Sobrevivem

4.2.5 A disposição aleatória das estirpes é importante para o desenvolvimento das colónias, como também para o desenvolvimento da infeção da *S. typhimurium* wild-type

Com o intuito de se perceber a forma como as interações decorrem em meio estruturado com inflamação local, e também para perceber como ocorre a formação das colónias e a disposição dos elementos de cada fenótipo da *S. typhimurium* na grelha, deliberámos proceder ao cálculo do parentesco. Desta forma, recorreremos às equações (3.6), (3.7) e (3.8) presentes no capítulo 3 (métodos). Considerámos realizar o parentesco às 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 horas para a *S. typhimurium* wild-type.

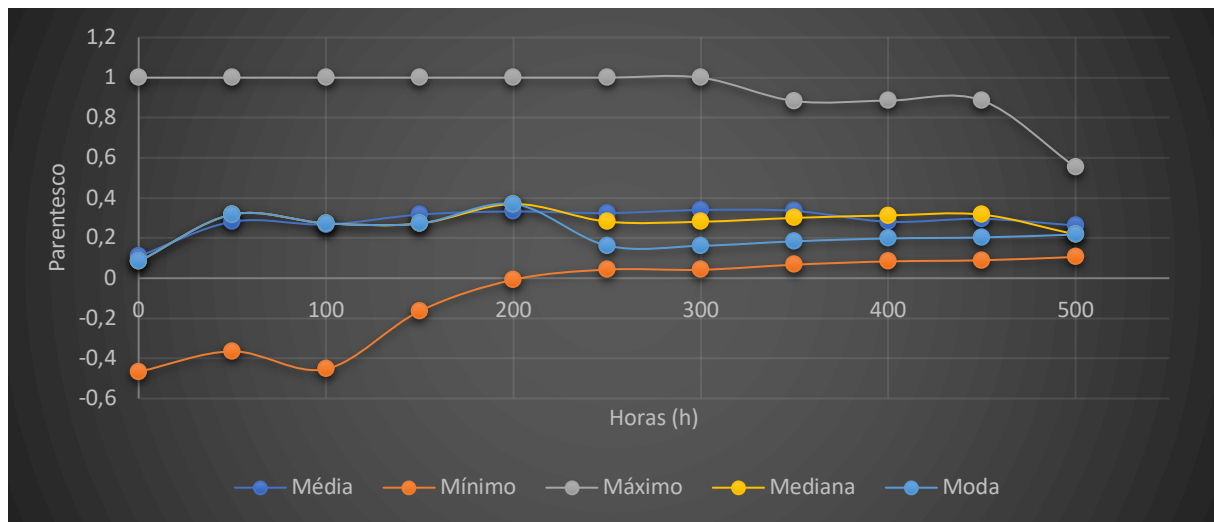


Figura 4.23 Parentesco. Distribuição da média, mínimo, máximo, mediana e moda para cada hora seleccionada do parentesco da *S. typhimurium* wild-type. O eixo do x representa as horas, e o eixo do y representa o parentesco.

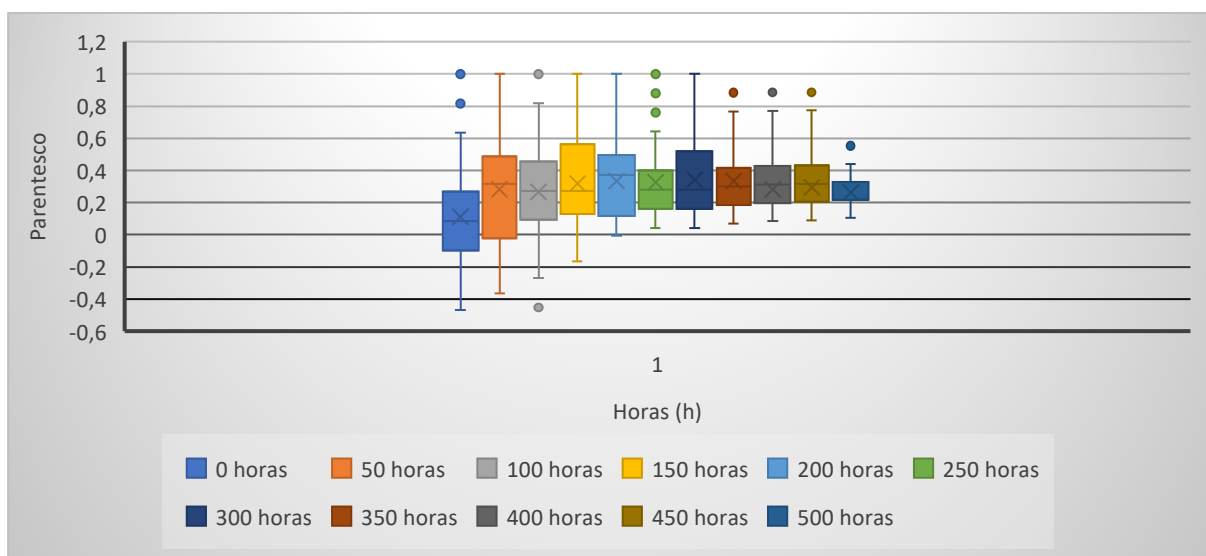


Figura 4.24 Boxplots com os valores de parentesco para cada indivíduo de *S. typhimurium* wild-type. Cada boxplot representa as horas estipuladas (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 horas), respetivamente. Podemos ver que nas primeiras horas os valores são mais baixos, e que com o passar das horas, os boxplots ficam constantes, diminuindo a variação nos valores de parentesco. O eixo do x representa as horas, e o eixo dos y representa o parentesco.

O parentesco permite verificar a relação existente com os vizinhos envolventes, neste caso num raio de 1.5 (8 vizinhos). Podemos ver através da média, que no início o parentesco é baixo, isso é devido à distribuição aleatória dos indivíduos pela grelha. Com o passar das horas, a média vai aumentando, devido à formação das colónias, mantendo-se praticamente constante até à *S. typhimurium* wild-type ser extinta do sistema (Fig.4.23 e Fig.4.24). Na Fig. 4.24, os resultados corroboram a afirmação anterior, uma vez que com o passar das horas e com o crescimento populacional e a formação de colónias de *S. typhimurium* wild-type os valores do parentesco começam a aumentar, passando de valores negativos para valores positivos, mantendo-se constantes. Contudo, o valor máximo de 1 permanece constante até as 300 horas e depois começa a diminuir gradualmente até às 500 horas, onde tem uma quebra acentuada para perto de 0.5. Isso ocorre devido às colónias começarem a perder os seus elementos e já não estarem rodeados completamente por outros indivíduos de *S. typhimurium* wild-type.

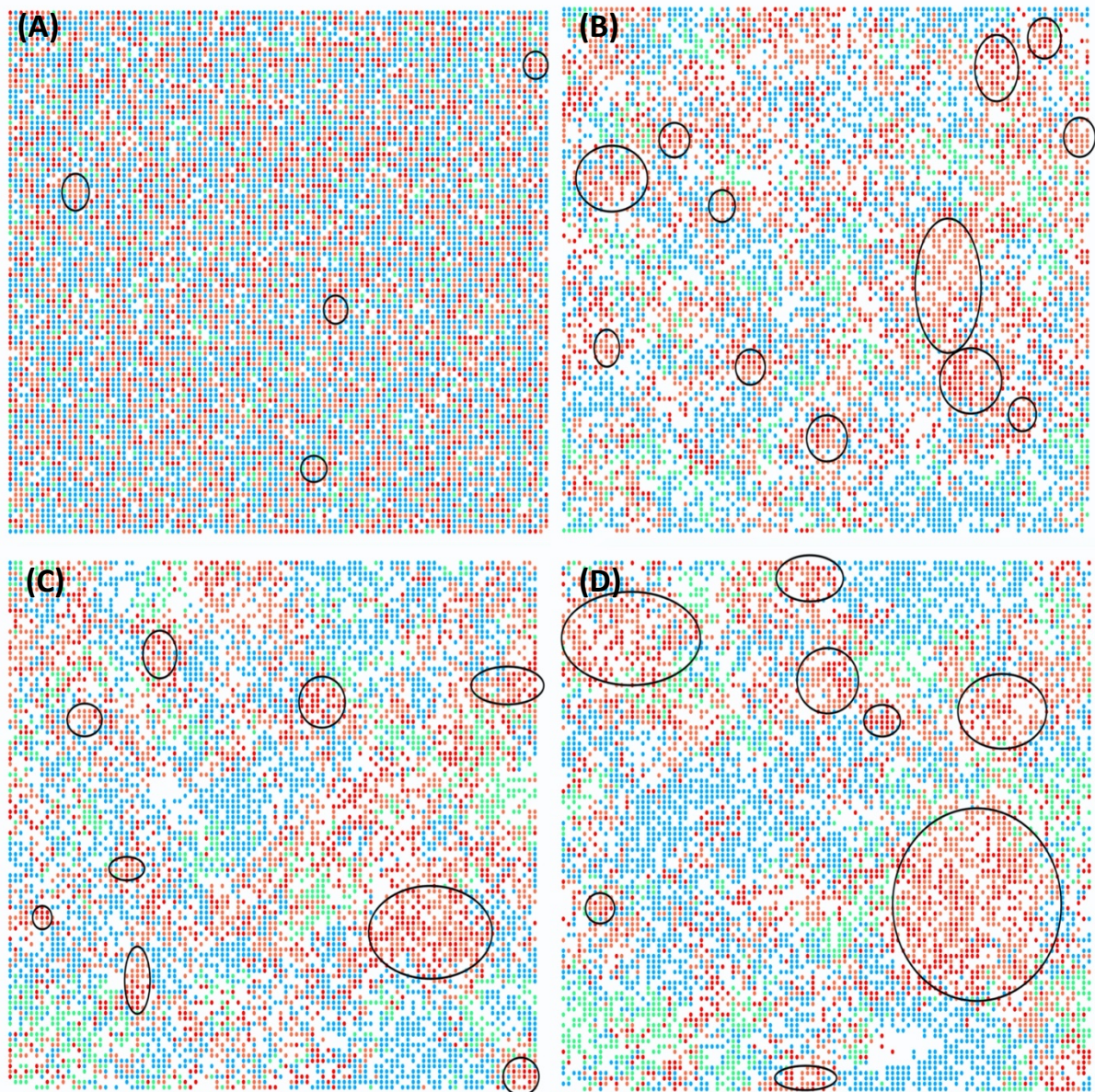


Figura 4.25 Distribuição das estirpes no sistema nas primeiras horas. Snapshoots às 0 horas (A), 5 horas (B), 10 horas (C) e 20 horas (D). Os círculos pretos representam as colónias de *S. typhimurium* wild-type. Em todos os círculos existem pelo menos um indivíduo que apresenta um valor de parentesco 1. Podemos ver nestes snapshoots a forma como as colónias se vão deslocando na grelha e aumentando de indivíduos nas primeiras horas, devido à disponibilidade de “bens-comuns” por parte do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. Estes “bens-comuns” beneficiam o crescimento e a permanência da *S. typhimurium* wild-type no sistema.

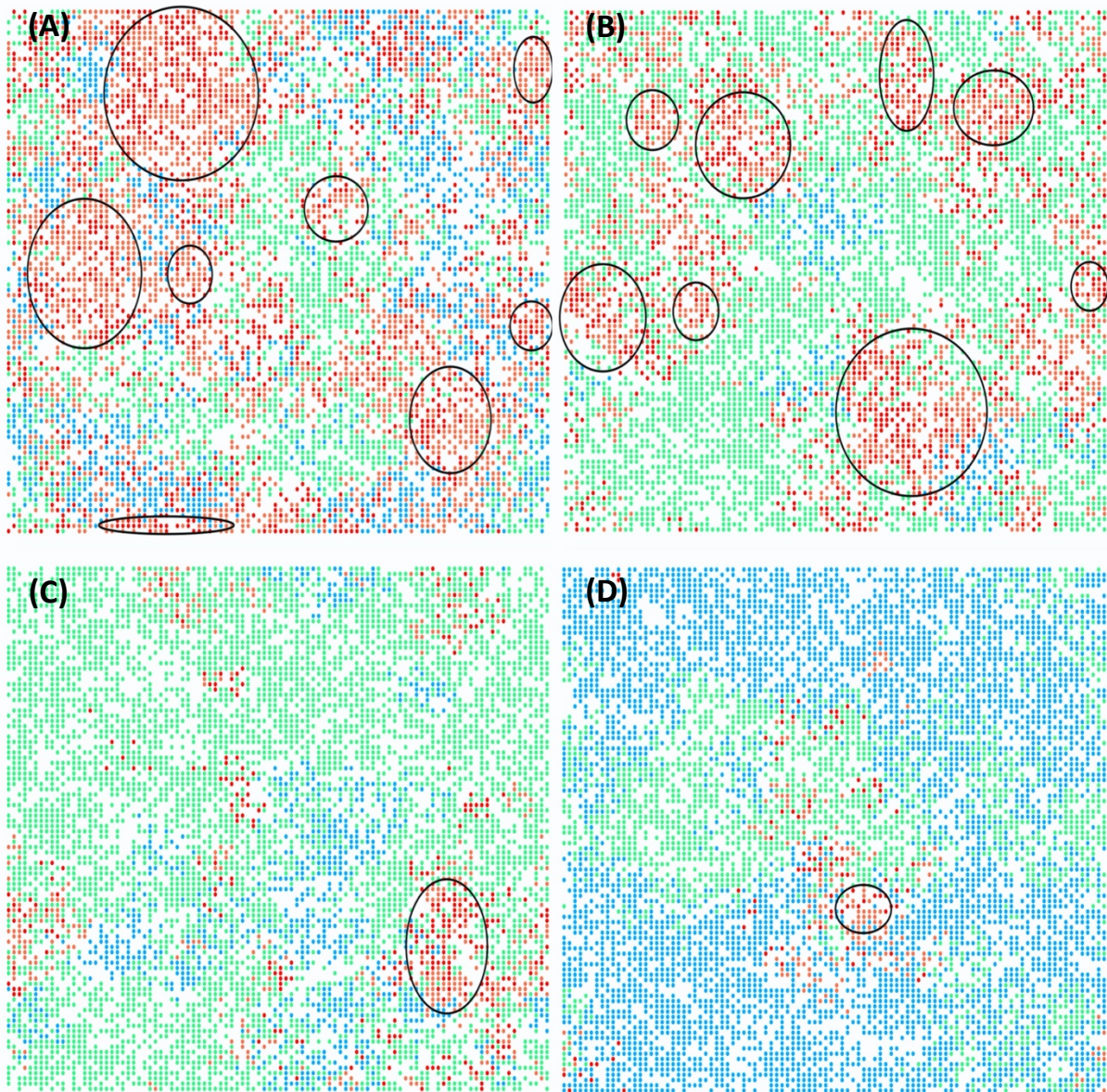


Figura 4.26 Distribuição das estirpes no sistema ao longo da simulação. Snapshoots às 50 horas (A), 150 horas (B), 250 horas (C) e 400 horas (D). Os círculos pretos representam as colónias de *S. typhimurium* wild-type. Em todos os círculos existem pelo menos um indivíduo que apresenta um valor de parentesco 1, com exceção do círculo às 400 horas, que apresenta um valor muito perto de 1. Às 400 horas a colónia de *S. typhimurium* wild-type está a perder elementos e quase a ser extinta do sistema. Podemos ver nestes snapshoots a forma como as colónias se vão deslocando e perdendo indivíduos devido ao crescimento das bactérias mutantes espontâneas não virulentas e também devido a estas consumirem os bens comuns disponibilizados pelo fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”.

Podemos ver na Fig. 4.25 que às 0 horas quando existe uma distribuição aleatória das estirpes no sistema, existem 4 zonas com um valor de parentesco 1. Isto significa que na vizinhança só existem indivíduos dos fenótipos *S. typhimurium*. Os resultados sugerem que às 5 e às 10 horas as pequenas colónias começam a surgir dessas 4 zonas onde existia um valor de parentesco 1, devido a essas zonas possuírem uma maior produtividade de *S. typhimurium* wild-type. Estas produzem “bens-comuns” para a vizinhança e, deste modo, possibilitam o crescimento rápido de mais indivíduos. Com o passar das horas, e com o crescimento muito rápido das bactérias mutantes espontâneas não virulentas, estas colónias de *S. typhimurium* wild-type começam a perder os seus elementos, que são substituídos por

“cheaters”, como é o caso das bactérias mutantes espontâneas não virulentas (Fig. 4.26). Estas bactérias mutantes espontâneas não virulentas vão consumir os bens-comuns (produtos da inflamação), desencadeado pelo fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”, e vão conseguir reduzir a virulência da *S. typhimurium* wild-type por competição por esses bens-comuns. Com o passar das horas, a *S. typhimurium* wild-type vai diminuindo a sua quantidade populacional como também o tamanho das suas colónias, e as bactérias mutantes espontâneas não virulentas vão ocupar esses espaços. No momento em que já não existe *S. typhimurium* wild-type na vizinhança, as bactérias mutantes espontâneas não virulentas começam a decrescer e a perder por competição para as bactérias comensais (Fig. 4.26).

5. Discussão

O objetivo desta tese era estudar os fenômenos de virulência cooperativa da *S. typhimurium* wild-type em meio estruturado, como também comparar com o modelo não estruturado produzido *in silico* por (Diard et al., 2013). Desta forma, começamos pela construção de dois modelos em meio estruturado, um com inflamação global e outro com inflamação local. Nos dois modelos distribuimos aleatoriamente na grelha quatro estirpes: dois fenótipos de *S. typhimurium*; bactérias mutantes espontâneas não virulentas e bactérias comensais. Realizamos as simulações e analisamos as diferenças entre as infecções em meio estruturado com inflamação global e local. Posteriormente, em cada meio procedemos à introdução de antibiótico e probiótico de forma a perceber a forma como estes influenciam e são relevantes para o término de uma infecção de *S. typhimurium* wild-type.

5.1 Diferenças entre os meios estruturados

Ao analisarmos os meios estruturados com inflamação global e local, identificamos diferenças pertinentes entre os modelos. Estas diferenças são sobretudo na concentração populacional e na duração do processo infeccioso.

Após as primeiras horas (cerca das 100 horas) no sistema, a *S. typhimurium* wild-type atinge a sua concentração populacional máxima, correspondendo a poucas horas após o despoletar da infecção. No meio estruturado com inflamação local (Fig. 4.18) a *S. typhimurium* wild-type atinge uma concentração populacional maior do que no meio estruturado com inflamação global (Fig. 4.13). Isto acontece devido às relações existentes e à inflamação apenas ocorrerem com os vizinhos envolventes, permitindo que os “bens-comuns” sejam unicamente distribuídos na vizinhança. (Yanni et al., 2019) considera que populações bacterianas que produzem toxinas difusíveis originam uma maior estrutura espacial quando ocorrem localmente. Isto pode ser uma forma de explicarmos a maior concentração populacional alcançada em meio estruturado com inflamação local (Fig. 4.18). A inflamação ao ocorrer localmente, vai fazer com que os “bens-comuns” disponibilizados pelo fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” sejam aproveitados somente pelas células presentes na vizinhança. Na vizinhança das bactérias que expressam o fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” localizam-se os indivíduos do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, que segundo (Diard & Hardt, 2017) beneficiam dos produtos da inflamação (“bens-comuns”) para crescer e se multiplicar. As bactérias do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” estão em constante competição por esses “bens-comuns” com as bactérias mutantes espontâneas não virulentas. Por outras palavras, os produtos da inflamação produzidos pelas *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” são consumidos quase exclusivamente pelas *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” que se encontram nesse local ou numa vizinhança muito próxima, por pertencerem à colónia da *S. typhimurium* wild-type. Desta forma, não existindo outras estirpes com quem partilhar os “bens-comuns”, a *S. typhimurium* wild-type vai beneficiar de todos os bens-comuns para continuar o seu crescimento e atingir quantidades populacionais mais elevadas no meio estruturado com inflamação local (Fig. 4.18) do que no meio estruturado com inflamação global (Fig. 4.13).

Outra diferença importante que também observamos foi a duração do processo infeccioso nos dois modelos. Em meio estruturado com inflamação global (Fig. 4.13) o tempo de infecção é muito longo, demorando em média cerca de 600 horas (25 dias). Este valor está muito próximo dos resultados computacionais obtidos por (Diard et al., 2013) (Fig. 1.4), onde simularam a infecção em meio líquido (ao utilizarem equações diferenciais, assumiram implicitamente que todas as bactérias se relacionam umas com as outras). Em meio estruturado com inflamação local o tempo de infecção é perto de 150 horas (6 dias), diferindo bastante relativamente ao caso do meio estruturado com inflamação global. De acordo com (Chlebicz & Ślizewska, 2018), a infecção por *S. typhimurium* wild-type num hospedeiro humano dura em média 7 dias, estando os nossos resultados em meio estruturado com inflamação local

dentro destes valores (Fig. 4.18). Desta forma, os nossos resultados sugerem que o intestino humano se comportar como um meio estruturado com inflamação local, e não como um meio líquido como assumiu (Diard et al., 2013).

5.2 A influência dos antibióticos numa infecção por *S. typhimurium* nos dois modelos em meio estruturado

Em relação à introdução de antibiótico nos dois modelos, que mata a totalidade da população *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e de bactérias mutantes espontâneas não virulentas, o resultado foi o domínio da *S. typhimurium* wild-type. A presença de antibiótico permitiu a dominância do sistema pela *S. typhimurium* wild-type, o que está de acordo com observações *in vivo* em ratinhos tratados com ciprofloxacina (Diard et al., 2014).

A dominância da *S. typhimurium* wild-type nos dois modelos analisados deveu-se ao seguinte (Figs. 4.15 e 4.19): quando se introduziu o antibiótico, que mata a totalidade do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e das bactérias mutantes espontâneas não virulentas, o sistema ficou ocupado pelas bactérias comensais e pelas bactérias com o fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON”. A *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” não é afetada pelo antibiótico, porque está presente no interior dos macrófagos, sendo tolerante à presença de antibiótico. (Diard et al., 2014), observou esta proteção das bactérias com fenótipo virulento quando realizaram as experiências em ratinhos. No entanto, (Arnoldini et al., 2014) em experimentos *in vitro*, foi mais longe na sua explicação, sendo a tolerância devido ao déficit de crescimento existente nas bactérias com fenótipo virulento, como também a proteção contra os antibióticos ser uma característica fenotípica e não genética. Nesta tese, observámos através do processo de virulência cooperativa, manifestada através do “bet-hedging” e da “divisão de tarefas”, que o fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” deu origem ao fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, continuando a crescer e a dominar o sistema (Figs. 4.15 e 4.19). A ausência das bactérias mutantes espontâneas não virulentas não permitiu o fim da infecção por *S. typhimurium* wild-type, uma vez que estas competem com o fenótipo da *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, pelos nutrientes disponíveis, conseguindo reduzir a virulência da *S. typhimurium* wild-type. Desta forma, a *S. typhimurium* wild-type permaneceu sem competição no sistema, perpetuando a infecção. Estes nossos resultados estão de acordo com o observado por (Diard & Hardt, 2017), que visualizou em ratinhos tratados com ciprofloxacina, o despoletar da infecção pelos dois fenótipos de *S. typhimurium* wild-type após a introdução de antibiótico.

A única diferença observada entre os modelos após a introdução de antibiótico, em meio estruturado com inflamação global e o meio estruturado com inflamação local, ocorreu no comportamento das bactérias comensais. Enquanto que no modelo com inflamação global o sistema é dominado pela *S. typhimurium* wild-type e as bactérias comensais são extintas do sistema (Fig. 4.15), no modelo com inflamação local, embora o sistema seja dominado pela *S. typhimurium* wild-type, as bactérias comensais permanecem no sistema (Fig. 4.19) (Diard et al., 2013) nos seus modelos *in silico* (meio líquido), realizou simulações apenas com *S. typhimurium* wild-type e bactérias comensais, levando à extinção das bactérias comensais do sistema. Estes resultados vão ao encontro dos nossos resultados em meio estruturado com inflamação global.

Contudo, os resultados obtidos nas simulações em meio estruturado com inflamação local aproximaram-se dos resultados das experiências realizadas *in vivo*, uma vez que manteve as estirpes *S. typhimurium* wild-type e bactérias comensais, mas mantendo estas em relativa baixa concentração (Fig. 4.19). Este resultado corrobora o que já foi demonstrado (Stecher et al., 2007), onde algumas estirpes bacterianas pertencentes às bactérias comensais conseguem persistir mesmo com a presença da *S. typhimurium* wild-type no sistema. (Stecher et al., 2007) realizaram experiências *in vivo*, que consistiram na infecção de ratinhos com *S. typhimurium* wild-type e a sequenciação do RNA de forma a obter informação sobre os filios das bactérias presentes, antes e durante a infecção por *S. typhimurium*

wild-type. (Stecher et al., 2007) chegaram à conclusão de que os filos presentes na microbiota perdem indivíduos ou desaparecem do intestino dos ratinhos, sendo que o único filo que conseguiu sobreviver a uma infecção por *S. typhimurium* wild-type foi o filo das firmicutes, permanecendo também no intestino algumas protobactérias. Desta forma, queremos salientar que numa infecção por *S. typhimurium* wild-type o intestino humano continuaria ocupado por bactérias comensais, como aconteceu no nosso modelo, em meio estruturado com inflamação local, uma vez que as bactérias do filo firmicutes são mais resistentes e conseguem compartilhar o sistema aquando de uma infecção por *S. typhimurium* wild-type.

5.2.1 Introdução de antibiótico bactericida é benéfica para findar uma infecção por *S. typhimurium* wild-type em meio estruturado com inflamação local

No meio estruturado com inflamação global a introdução de antibiótico que não mata a totalidade dos indivíduos levou ao sistema a ser dominado pela *S. typhimurium* wild-type e à extinção do sistema das bactérias comensais (Fig. 4.17), enquanto que em meio estruturado com inflamação local, a introdução de antibiótico que não mata a totalidade de indivíduos levou na maior parte das vezes à eliminação da *S. typhimurium* wild-type e à recuperação do sistema pelas bactérias comensais, sendo benéfico para findar a infecção (Fig. 4.22 e Tabela 4.10). Estes resultados, do meio estruturado com inflamação local, não vão ao encontro dos trabalhos de (Diard et al., 2014) e (Arnoldini et al., 2014). Os autores destes trabalhos observaram que a introdução de antibiótico não eliminou a *S. typhimurium* wild-type. Os nossos resultados em meio estruturado com inflamação local diferem destes trabalhos devido ao design “experimental”, uma vez que nas nossas simulações, o antibiótico só elimina uma certa percentagem da população bacteriana, levando a que não ocorra a morte da totalidade das bactérias mutantes espontâneas não virulentas (Tabela 4.10). Desta forma, as mutantes sobreviventes ajudam a baixar o número de bactérias de *S. typhimurium* wild-type e, com isso, findar a infecção e ajudando as bactérias comensais a recuperar no sistema. Desta forma, constatámos que, em meio estruturado com inflamação local, a introdução de antibiótico que não mata a totalidade dos indivíduos no sistema é benéfica para findar uma infecção por *S. typhimurium* (Fig. 4.22).

5.3 Os probióticos como forma de findar uma infecção por *S. typhimurium*

Em relação aos probióticos, os resultados nos dois modelos (em meio estruturado com inflamação local e meio estruturado com inflamação global) foram dispares. O probiótico em todos os espaços livres no meio estruturado com inflamação local, levou dentro do processo infeccioso a uma recuperação da infecção, à eliminação da *S. typhimurium* wild-type do sistema e ao domínio das bactérias comensais (Fig. 4.21). Só quando introduzimos o probiótico no início, no fim ou quando há menos bactérias de *S. typhimurium* wild-type do que comensais, é que o sistema variou entre o domínio das bactérias comensais com a extinção da *S. typhimurium* wild-type e o domínio das bactérias comensais com a permanência em concentrações baixas da *S. typhimurium* wild-type (Fig. 4.20). No meio estruturado com inflamação global, o processo de introdução foi imprevisível. Quando introduzimos o probiótico durante o processo infeccioso, nalguns casos a *S. typhimurium* wild-type dominou em algumas horas, eliminando as bactérias comensais, mas noutros casos ocorreu o contrário, com domínio das bactérias comensais durante algumas horas e eliminando a *S. typhimurium* wild-type (Tabela 4.7 e 4.8). Desta forma, constatámos que a introdução de probiótico em meio estruturado com inflamação global não foi benéfica em algumas horas no processo infeccioso, dependendo das concentrações das estirpes no momento da introdução do probiótico (Tabela 4.8). No entanto, no meio estruturado com inflamação local a introdução de probiótico no processo infeccioso foi benéfica para findar a infecção por *S. typhimurium* wild-type (Fig. 4.21). Contudo, quando há menos bactérias de *S. typhimurium* wild-type do que comensais existe uma variação entre a eliminação e a permanência da *S. typhimurium* no sistema (Fig.4.20).

Nesta altura ainda não existem muitos estudos que refiram o impacto dos probióticos na virulência cooperativa da *S. typhimurium* wild-type. Os estudos existentes são maioritariamente *in vivo* e vão ao encontro dos nossos resultados de que a introdução de probiótico em meio estruturado com inflamação local é benéfica para findar a infeção de *S. typhimurium*. Um desses estudos foi o desenvolvido por (Cordeiro et al., 2019), que teve como objetivo perceber a forma como a administração oral de soro de leite fermentado com probióticos era benéfica para proteger e também findar infeções de *S. typhimurium* em ratinhos. Neste estudo chegaram à conclusão que bebidas à base de soro de leite fermentado com probióticos como *L. lactis* e *L. casei* (bactérias do filo firmicutes) são benéficas para uma recuperação mais rápida da infeção por *S. typhimurium*. Outro estudo também realizado *in vivo*, corroborou os nossos resultados em meio estruturado com inflamação local. Este estudo realizado por (Deriu et al., 2013) consistiu na infeção de ratinhos com *S. typhimurium* e após alguns dias de infeção introduziram bactérias *E. coli* Nissle como probiótico. Neste aspeto, a introdução de *E. coli* proporcionou a diminuição da inflamação e com isso ocorreu uma remissão da infeção por *S. typhimurium* wild-type. Isso aconteceu porque a *E. coli* conseguiu libertar os iões de ferro da lipocalina-2, que permite às bactérias comensais terem mais nutrientes disponíveis para o seu crescimento. Quando a inflamação é despoletada, o hospedeiro liberta a lipocalina-2 no meio de forma a inibir o uso do ião ferro pelas bactérias (Wotzka et al., 2017). Desta forma, a presença de probióticos em meio estruturado é favorável para o sistema recuperar da infeção despoletada pela *S. typhimurium* wild-type e para as bactérias comensais voltarem a dominar o sistema.

5.3.1 A introdução de probióticos intensifica a competição no meio estruturado com inflamação local

Algo ainda não muito estudado são as relações do probiótico com as estirpes envolventes em meio estruturado com inflamação local. Nas nossas simulações deparámo-nos com a variação da eliminação e a permanência da *S. typhimurium* wild-type no sistema (Figs. 4.20 e 4.21). Dentro do processo infeccioso a *S. typhimurium* wild-type foi sempre expulsa, no entanto, quando há menos bactérias de *S. typhimurium* wild-type do que comensais o resultado foi a variação da eliminação e permanência no sistema, como vimos anteriormente. Os motivos que podem levar a esta variação, são a competição entre as estirpes, a disposição espacial do probiótico, assim como o processo de resistência à colonização.

Percebemos que a introdução de probiótico intensifica a competição entre todas as estirpes, devido à disposição espacial das estirpes no sistema, como também da posição na grelha que o probiótico vai ocupar. No processo infeccioso a introdução de probiótico permitiu a eliminação da *S. typhimurium* wild-type do sistema. Aqui, a concentração populacional de bactérias comensais e de bactérias mutantes espontâneas não virulentas é baixa e a concentração populacional da *S. typhimurium* wild-type é alta. A introdução de probiótico vai permitir que as bactérias mutantes espontâneas não virulentas continuem o processo de competição com as bactérias dos fenótipos de *S. typhimurium*, proporcionando apenas um aumento populacional das bactérias comensais (Fig. 4.21).

No entanto, a introdução de probiótico quando há menos bactérias de *S. typhimurium* wild-type do que comensais levou a resultados disparees. A variação entre a permanência e eliminação da *S. typhimurium* wild-type do sistema deveu-se às concentrações populacionais antes da introdução do probiótico. Quando há menos bactérias de *S. typhimurium* wild-type do que comensais, a *S. typhimurium* apresenta uma baixa concentração populacional e as bactérias mutantes espontâneas não virulentas como as bactérias comensais apresentam uma elevada concentração populacional. A introdução de probiótico (bactérias comensais) vai aumentar a concentração populacional das bactérias comensais, intensificando a competição com as bactérias mutantes espontâneas não virulentas. Esta competição ocorre em função do probiótico ir ocupar os espaços livres dentro das colónias das bactérias mutantes

espontâneas não virulentas. Uma vez que estas são as estirpes que estão em maior abundância na grelha, a probabilidade de terem indivíduos do fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁺ - “ON” é baixa, levando a que não existam “bens-comuns” disponibilizados por este fenótipo. Logo, as bactérias mutantes espontâneas não virulentas terão de consumir os mesmos nutrientes das bactérias comensais. Desta maneira, perdem a competição com as comensais, pois estas têm um consumo mais otimizado dos nutrientes disponíveis no lúmen. Este processo de competição e de redução dos nutrientes no lúmen intestinal por parte das bactérias comensais é um processo muito estudado e designado como resistência à colonização. (Lorian, 1994) desenvolveu um estudo em ratinhos que permitiu perceber o processo de resistência à colonização, demonstrando que a microbiota tem um papel de proteção do intestino. Mais tarde, (Stecher et al., 2007) também identificou este processo de resistência à colonização nas suas experiências *in vivo* em ratinhos quando os tentava infetar com *S. typhimurium*. Este processo de resistência à colonização permite às bactérias comensais recuperarem e multiplicarem-se. Consequentemente, as bactérias comensais ganham a competição por nutrientes e espaço livre às bactérias mutantes espontâneas não virulentas. Assim, fornece à *S. typhimurium* wild-type a possibilidade de sobreviver no sistema, e com isso de aumentar a sua concentração populacional. Todavia, a diminuição drástica das bactérias mutantes espontâneas não virulentas, devido à competição, pode levar à sua extinção do sistema. A eliminação das bactérias mutantes espontâneas não virulentas, resulta num equilíbrio constituído apenas pela *S. typhimurium* wild-type e as bactérias comensais, algo que já tinha acontecido com a introdução de antibiótico no meio estruturado com inflamação local (Fig. 4.20). Estes nossos resultados vão ao encontro do referido por (Ghoul & Mitri, 2016) onde, com o passar do tempo, a competição entre as estirpes vai diminuindo ficando o sistema em equilíbrio.

Resumindo, estes processos de competição entre as estirpes acontecem de acordo com o local ocupado pelas bactérias do probiótico. Sendo assim, as estirpes formam colónias e vivem em comunidade para dividirem o trabalho por cada indivíduo de forma a ser menos dispendioso para uma única célula (Ackermann, 2015; Sturm et al., 2011). Nas Figs. 4.25 e 4.26 é possível ver as formações das colónias e a forma como o parentesco influencia a distribuição das colónias ao longo do tempo. Quando as bactérias do probiótico vão preencher os espaços no meio das colónias, essas bactérias comensais entram num processo de competição com as estirpes envolventes (Yanni et al., 2019). Assim, embora estes processos de competição entre estirpes em meio estruturado já estejam bem estudados *in vitro* e *in vivo*, seja em processos envolvendo a virulência cooperativa em *S. typhimurium*, como também a sua relação com o antibiótico, como visto anteriormente, no entanto são escassos os estudos em meio estruturado das relações existentes entre probiótico e a *S. typhimurium*.

6. Conclusão

De acordo com os nossos resultados, concluímos que a disposição das estirpes no sistema e as suas relações com a vizinhança são muito importantes num meio estruturado com inflamação local. No entanto, vimos também que as bactérias mutantes espontâneas não virulentas são cruciais na evolução do sistema, porque permitem a recuperação e o fim de uma infecção por *S. typhimurium* wild-type. São as mutantes que fazem diminuir a virulência da *S. typhimurium* wild-type, através do consumo dos produtos da inflamação (“bens-comuns”) competindo neste caso com o fenótipo *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF”, ultrapassando-as em número e permitindo deste modo que as bactérias comensais voltem a recuperar no sistema e a ajudar o hospedeiro a recuperar a homeostase microbiana.

Os modelos estudados nesta tese sugerem que o uso de antibióticos numa infecção por *S. typhimurium* wild-type difere de acordo com a inflamação ser local ou global. A introdução de antibiótico que matam a totalidade das estirpes *S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e bactérias mutantes espontâneas não virulentas é prejudicial para a recuperação do sistema, em ambos os casos. No entanto, a introdução de antibiótico que mata uma determinada percentagem de indivíduos (*S. typhimurium* TTSS-1⁻ - “OFF” e bactérias mutantes espontâneas não virulentas) no meio estruturado com inflamação local é mais eficiente na eliminação da infecção por *S. typhimurium* wild-type, do que no caso de inflamação global.

O uso de probióticos não é prejudicial para o hospedeiro, tendo benefícios para findar uma infecção por *S. typhimurium* wild-type como também para repor a homeostase da microbiota nos dois modelos. Contudo, o uso de probióticos, é algo incerto uma vez que depende de diversos fatores para ter um efeito positivo na finalização da infecção. Esses fatores são as concentrações populacionais das estirpes envolvidas, competição entre estirpes e disposição do probiótico espacialmente, sendo algo que deve ser estudado em maior detalhe, de forma a perceber-se a sua dinâmica e impacto na saúde.

Contudo, consideramos que projetos futuros nesta área são importantes. Reconhecemos ser importante a realização de projetos *in vitro* e *in silico* com probióticos na infecção por *S. typhimurium* wild-type. Em relação ao nosso estudo, consideramos que uma alteração no design experimental pode ser importante para perceber melhor a dinâmica da inflamação no meio estruturado com inflamação local. O nosso design experimental contemplou todas as estirpes na mesma grelha (efeito 2D), e consideramos que trabalhos futuros possam passar pela criação de duas grelhas (efeito 3D), representando assim o lúmen e as células do epitélio intestinal. Estas duas grelhas vão permitir um estudo mais pormenorizado em relação às variações flutuantes do intestino e também à forma como a *S. typhimurium* wild-type consegue sobreviver nesses ambientes.

7. Bibliografia

- Acar, M., Mettetal, J. T., & Van Oudenaarden, A. (2008). Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nature Genetics*, *40*(4), 471-475. <https://doi.org/10.1038/ng.110>
- Ackermann, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(8), 497-508. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>
- Ackermann, M., Stecher, B., Freed, N. E., Songhet, P., Hardt, W. D., & Doebeli, M. (2008). Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature*, *454*(7207), 987-990. <https://doi.org/10.1038/nature07067>
- Aggeletopoulou, I., Konstantakis, C., Assimakopoulos, S. F., & Triantos, C. (2019). The role of the gut microbiota in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Microbial Pathogenesis*, *137*(May), 103774. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103774>
- Arnoldini, M., Vizcarra, I. A., Peña-Miller, R., Stocker, N., Diard, M., Vogel, V., Beardmore, R. E., Hardt, W. D., & Ackermann, M. (2014). Bistable expression of virulence genes in salmonella leads to the formation of an antibiotic-tolerant subpopulation. *PLoS Biology*, *12*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001928>
- Bai, A. P., & Ouyang, Q. (2006). Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Postgraduate Medical Journal*, *82*(968), 376-382. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.040899>
- Brenner, F., Villar, R., Angulo, F., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). Salmonella Nomenclature. *Journal of clinical Microbiology*, *17*(2), 2465-2467.
- Chlebicz, A., & Ślizewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(5), 1-28. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
- Chua, K. J., Kwok, W. C., Aggarwal, N., Sun, T., & Chang, M. W. (2017). Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*, *40*, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.04.011>
- Cordeiro, M. A., Souza, E. L. S., Arantes, R. M. E., Balthazar, C. F., Guimarães, J. T., Scudino, H., Silva, H. L. A., Rocha, R. S., Freitas, M. Q., Esmerino, E. A., Silva, M. C., Pimentel, T. C., Granato, D., Costa, R. G. B., Cruz, A. G., & Martins, F. S. (2019). Fermented whey dairy beverage offers protection against Salmonella enterica ssp. enterica serovar Typhimurium infection in mice. *Journal of Dairy Science*, *102*(8), 6756-6765. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16340>
- Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiología (Madrid, Spain)*, *12*(1), 9-16. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>
- Deriu, E., Liu, J. Z., Pezeshki, M., Edwards, R. A., Ochoa, R. J., Contreras, H., Libby, S. J., Fang, F. C., & Raffatellu, M. (2013). Probiotic bacteria reduce salmonella typhimurium intestinal colonization by competing for iron. *Cell Host and Microbe*, *14*(1), 26-37. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.06.007>
- Derrien, M., Alvarez, A. S., & de Vos, W. M. (2019). The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology*, *27*(12), 997-1010. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>
- Diard, M., Garcia, V., Maier, L., Remus-Emsermann, M. N. P., Regoes, R. R., Ackermann, M., & Hardt, W. D. (2013). Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature*, *494*(7437), 353-356. <https://doi.org/10.1038/nature11913>
- Diard, M., & Hardt, W.-D. (2017). Basic Processes in Salmonella-Host Interactions: Within-Host Evolution and the Transmission of the Virulent Genotype. *Microbiology Spectrum*, *5*(5), 1-11. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mtbp-0012-2016>
- Diard, M., Sellin, M. E., Dolowschiak, T., Arnoldini, M., Ackermann, M., & Hardt, W. D. (2014). Antibiotic treatment selects for cooperative virulence of salmonella typhimurium. *Current Biology*, *24*(17), 2000-2005. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.028>
- Dronkers, T. M. G., Ouwehand, A. C., & Rijkers, G. T. (2020). Global analysis of clinical trials with probiotics. *Heliyon*, *6*(7), e04467. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04467>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, *8*(3), 284-293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Estrela, S., & Brown, S. P. (2013). Metabolic and Demographic Feedbacks Shape the Emergent Spatial

- Structure and Function of Microbial Communities. *PLoS Computational Biology*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003398>
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308-341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*, 24(10), 833-845. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>
- Guimarães, D. O., Da Silva Momesso, L., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), 667-679. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>
- Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2018). Salmonella Typhimurium metabolism affects virulence in the host – A mini-review. *Food Microbiology*, 71, 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.016>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(Figure 1), 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Islam, S. U. (2016). Clinical Uses of Probiotics. *Medicine*, 95(5), e2658. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002658>
- Jajere, S. M. (2019). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504-521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Kim, S., Covington, A., & Pamer, E. G. (2019). The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens Sohn. *Physiology & behavior*, 176(3), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- López, F. E., de las Mercedes Pescaretti, M., Morero, R., & Delgado, M. A. (2012). Salmonella Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? *Food Research International*, 45(2), 842-851. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.009>
- Lorian, V. (1994). Colonization resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(7), 1693. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.7.1693>
- Maier, L., Barthel, M., Stecher, B., Maier, R. J., Gunn, J. S., & Hardt, W. D. (2014). Salmonella Typhimurium strain ATCC14028 requires H2-hydrogenases for growth in the gut, but not at systemic sites. *PLoS ONE*, 9(10), 1-6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110187>
- Martins, B. M. C., & Locke, J. C. W. (2015). Microbial individuality: how single-cell heterogeneity enables population level strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.003>
- Monack, D. M. (2012). Salmonella persistence and transmission strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.013>
- Müller, J., Spriewald, S., Stecher, B., Stadler, E., & Fuchs, T. M. (2019). Evolutionary Stability of Salmonella Competition with the Gut Microbiota: How the Environment Fosters Heterogeneity in Exploitative and Interference Competition. *Journal of Molecular Biology*, 431(23), 4732-4748. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.027>
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688-693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Ohl, M. E., & Miller, S. I. (2001). Salmonella: A Model for Bacterial Pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52(1), 259-274. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.52.1.259>
- Oliveira, R. A., Ng, K. M., Correia, M. B., Cabral, V., Shi, H., Sonnenburg, J. L., Huang, K. C., & Xavier, K. B. (2020). Klebsiella michiganensis transmission enhances resistance to Enterobacteriaceae gut invasion by nutrition competition. *Nature Microbiology*, 5(4), 630-641. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0658-4>
- Parker, E., Tina, R., & Christopher, R. D. (2017). Probiotics and Gastrointestinal Conditions: An Overview of Evidence from the Cochrane Collaboration Elizabeth. *Physiology & behavior*, 176(12), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Rabsch, W., Tschäpe, H., & Bäuml, A. J. (2001). Non-typhoidal salmonellosis: Emerging problems. *Microbes and Infection*, 3(3), 237-247. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01375-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01375-2)
- Revolledo, L., Ferreira, A. J. P., & Mead, G. C. (2006). Prospects in Salmonella control: Competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *Journal of Applied Poultry*

- Research*, 15(2), 341-351. <https://doi.org/10.1093/japr/15.2.341>
- Stecher, B., & Hardt, W. D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends in Microbiology*, 16(3), 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.008>
- Stecher, B., & Hardt, W. D. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.003>
- Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A. W., Westendorf, A. M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A. J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., Von Mering, C., & Hardt, W. D. (2007). Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(10), 2177-2189. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050244>
- Sturm, A., Heinemann, M., Arnoldini, M., Benecke, A., Ackermann, M., Benz, M., Dormann, J., & Hardt, W. D. (2011). The cost of virulence: Retarded growth of salmonella typhimurium cells expressing type iii secretion system 1. *PLoS Pathogens*, 7(7), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002143>
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., & Bäumlner, A. J. (2012). Salmonella, the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.002>
- Tsai, C. N., & Coombes, B. K. (2019). The Role of the Host in Driving Phenotypic Heterogeneity in Salmonella. *Trends in Microbiology*, 27(6), 508-523. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.004>
- Vrese, M. De. (2001). *Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition* 1–3. 73(14).
- Winter, S. E., Keestra, A. M., Tsolis, R. M., & Bäumlner, A. J. (2010). The blessings and curses of intestinal inflammation. *Cell Host and Microbe*, 8(1), 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.003>
- Wotzka, S. Y., Nguyen, B. D., & Hardt, W. D. (2017). Salmonella Typhimurium Diarrhea Reveals Basic Principles of Enteropathogen Infection and Disease-Promoted DNA Exchange. *Cell Host and Microbe*, 21(4), 443-454. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.009>
- Yanni, D., Márquez-Zacarias, P., Yunker, P. J., & Ratcliff, W. C. (2019). Drivers of Spatial Structure in Social Microbial Communities. *Current Biology*, 29(11), R545-R550. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.068>
- Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 9(6). <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>
- Zha, L., Garrett, S., & Sun, J. (2019). Salmonella Infection in Chronic Inflammation and Gastrointestinal Cancer. *Diseases*, 7(1), 28. <https://doi.org/10.3390/diseases7010028>
- Zhang, S., Kingsley, R. A., Santos, R. L., Andrews-polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R. M., Adams, L. G., & Ba, A. J. (2003). Molecular Pathogenesis of Salmonella enterica Serotype. *Infection and Immunity*, 71(1), 1-12. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.1>

