



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul Gabinete
do Reitor
Rua Gen. Osório, 348 – Centro – Bento Gonçalves/RS – CEP 95.700-086
Telefone: (54) 3449.3300 – www.ifrs.edu.br – E-mail: gabinete@ifrs.edu.br

ANEXO III

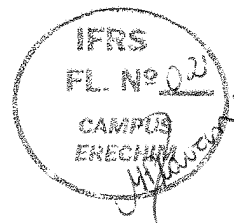
FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE AFASTAMENTO

ORIENTAÇÕES GERAIS

1. Anexar os documentos comprobatórios previstos no artigo 33, desta Instrução Normativa, nos casos de afastamento com substituição.
2. Anexar os documentos comprobatórios previstos nos artigos 36 e 37, desta Instrução Normativa, nos casos de afastamento sem substituição.
3. Somente anexar os documentos necessários para comprovação do declarado neste formulário.

CAMPO I - DADOS CADASTRAIS

Nome do Servidor: Luiza Pieta	
E-mail Institucional: luiza.pieta@erechim.ifrs.edu.br	Cel.: (51) 99712-4190
Universidade de Destino: Trinity College Dublin	
Nome do Programa de Pós-Graduação: Não se aplica	
Nível: () Mestrado () Doutorado (<input checked="" type="checkbox"/>) Pós-Doutorado	
Nome do Orientador: Marta Martins	
Área de Concentração: Microbiologia	
Início do Curso (regular): 01/03/2019	
Início da Bolsa (se bolsista): Não se aplica	
Financiador/Modalidade da Bolsa (ex. Capes/PIQDTec 1): Não se aplica	
Início do Afastamento: 01/03/2019	
Término do Afastamento (data de defesa): 29/02/2020	



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul Gabinete
do Reitor
Rua Gen. Osório, 348 – Centro – Bento Gonçalves/RS – CEP 95.700-086
Telefone: (54) 3449.3300 – www.ifrs.edu.br – E-mail: gabinete@ifrs.edu.br

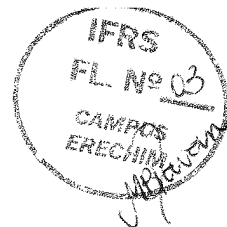
CAMPO II - AFASTAMENTO SEM SUBSTITUIÇÃO

NOS AFASTAMENTOS COM SUBSTITUIÇÃO NÃO PREENCHER ESTE CAMPO
<input checked="" type="checkbox"/> 1º Afastamento
Solicita afastamento para o período de (período máximo de 01 (um) ano): _____ 01 _____ / _____ 03 _____ / _____ 2019 _____ a _____ 29 _____ / _____ 02 _____ / _____ 2020 _____
<input type="checkbox"/> Prorrogação Afastamento
Solicita Afastamento para o período de (período máximo de 01 (um) ano): _____ / _____ / _____ a _____ / _____ / _____

Para preenchimento do IFRS

À CAGPPI local,
Solicita-se, respeitosamente, seu parecer referente ao afastamento do servidor com base nos documentos apresentados.
O servidor está com o projeto de pesquisa cadastrado em sistema institucional no período da presente solicitação? <input checked="" type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO
O servidor está cadastrado em grupo de pesquisa do CNPq no período da presente solicitação? <input checked="" type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SE APLICA
Data: <u>12/11/2019</u>
 Assinatura e Carimbo do Presidente da CAGPPI Assinatura, Nome Legível e Portaria

Adriana Troczinski Storti
Coordenadora de Pesquisa,
Pós-Graduação e Inovação
Port. nº 222 DOU de 01/11/17
IFRS Campus Erechim



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul Gabinete
do Reitor
Rua Gen. Osório, 348 – Centro – Bento Gonçalves/RS – CEP 95.700-086
Telefone: (54) 3449.3300 – www.ifrs.edu.br – E-mail: gabinete@ifrs.edu.br

À Direção de Ensino,

Com base nos documentos apresentados, o programa de pós-graduação ou pós-doutorado, para o qual o professor pretende o afastamento:

Está correlacionado com a área de graduação ou pós-graduação do professor; ou com a área na qual o professor prestou concurso no IFRS; ou com a área na qual o professor atua no IFRS?

SIM

NÃO

Em caso negativo expor as motivações:

Há interesse da administração no afastamento do servidor, em específico sobre as atividades de ensino do IFRS?

SIM

NÃO

Em caso negativo expor as motivações:

Solicita-se, respeitosamente, seu parecer referente ao afastamento do servidor com base nos documentos apresentados.

Está ciente da necessidade de substituição do professor afastado?

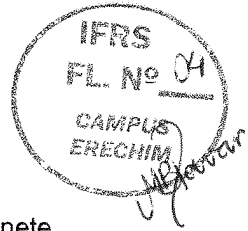
SIM

NÃO SE APLICA

Data: 16/11/18

Flauto
Assinatura e Carimbo do Diretor de Ensino
Assinatura, Nome Legível e Portaria

MOENILUCLIANE DE SANTOS
Diretora do Departamento de Ensino
Portaria 18 de 01/02/2016
IFRS - Campus Erechim



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul Gabinete
do Reitor

Rua Gen. Osório, 348 – Centro – Bento Gonçalves/RS – CEP 95.700-086
Telefone: (54) 3449.3300 – www.ifrs.edu.br – E-mail: gabinete@ifrs.edu.br

À Direção-Geral de *campus*,

Solicita-se, respeitosamente, seu parecer referente ao afastamento do servidor com base nos documentos apresentados.

Há interesse da administração no afastamento do servidor?

() SIM () NÃO

Data: __/__/__

Assinatura e Carimbo do Diretor-geral de *Campus*
Assinatura, Nome Legível e Portaria

À Diretoria de Gestão de Pessoas do IFRS,

Solicita-se, respeitosamente, seu parecer referente ao afastamento do servidor com base nos documentos apresentados.

O servidor cumpriu com a entrega da documentação, conforme art. 33 ou 36 e 37?

() SIM () NÃO

Data: __/__/__

Assinatura e Carimbo do Diretor de Gestão de Pessoas
Assinatura, Nome Legível e Portaria

À PROPPI,

Solicita-se, respeitosamente, seu parecer referente ao afastamento do servidor com base nos documentos apresentados.

O programa de pós-graduação cumpre a exigência do §2º art. 3º desta Instrução Normativa?

() SIM () NÃO () NÃO SE APLICA (casos de afastamento do país)

Encaminha a solicitação para publicação da portaria pelo Reitor?

() SIM () NÃO

Data: __/__/__

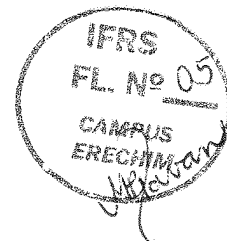
Assinatura e Carimbo do Pró-reitor da PROPPI

Assinatura, Nome Legível e Portaria

Data: 09/11/2018

Luizita Pires

Assinatura do Servidor



Coláiste na Tríonóide, Baile Átha Cliath
Trinity College Dublin

Ollscoil Átha Cliath | The University of Dublin

Dublin, 17th October 2018

Re: Acceptance of Dr. Luiza Pieta to perform research at a Post-Doc level in Dr. Martins's lab at Trinity College Dublin.

This is a letter of acceptance written in behalf of Dr. Luiza Pieta for her to conduct research at a post-Doctoral level. Dr. Luiza Pieta will integrate my research group in Antimicrobial Resistance and Host Modulation located at the Moyné Institute of Preventive Medicine, School of Genetics and Microbiology, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland from the 1st March of 2019 to the 29th February of 2020. During that time, Dr. Pieta will be under my guidance and will receive training and conduct post-Doctoral studies in the area of *Salmonella* infection and virulence. I can assure that my laboratory will cover all the research-related costs with this project, during Dr. Pieta staying. I can also state that my laboratory has all the required facilities (biosafety level 2) to support the type of work to be conducted, as well as access to other core and shared facilities in the Institute and University, if needed.

It will be a pleasure to receive Dr. Pieta in my research group and laboratory for the designated time frame.

Kind regards,

Marta Martins, PhD

Assistant Professor in Microbiology
Department of Microbiology,
Moyné Institute of Preventive Medicine,
School of Genetics and Microbiology,
Trinity College Dublin, the University of Dublin
Dublin 2, Ireland.
+353 1 896 1194
mmartins@tcd.ie
www.tcd.ie

Roinn na Micribhitheolaíochta
Institiúid Moyné um Leigheas Coiscéartha
An Scoil Síneolaíochta agus
Micribhitheolaíochta
Coláiste na Tríonóide
Baile Átha Cliath 2, Éire

Department of Microbiology
The Moyné Institute of Preventive Medicine
School of Genetics and Microbiology
Trinity College Dublin
Dublin 2, Ireland

+353 1 896 1194/1199
magovern@tcd.ie/forsyth@tcd.ie
<http://www.tcd.ie/Microbiology/>



Coláiste na Tríonóide, Baile Átha Cliath
Trinity College Dublin
Ollscoil Átha Cliath | The University of Dublin



(VERSÃO TRADUZIDA)

Dublin, 17 de outubro de 2018.

Assunto: Carta de aceite da Dr^a. Luiza Pieta para realização de pesquisa a nível de Pós-Doutorado no laboratório da Dr^a. Martins na Trinity College Dublin.

Esta é uma carta de aceite escrita em nome da Dr^a. Luiza Pieta para ela conduzir pesquisas em nível de Pós-Doutorado. A Dr^a. Luiza Pieta integrará meu grupo de pesquisa sobre Resistência Antimicrobiana e Modulação do Hospedeiro, localizado no Instituto Moyne de Medicina Preventiva, Faculdade de Genética e Microbiologia, Trinity College Dublin, Dublin, Irlanda, de 1º de março de 2019 a 29 de fevereiro de 2020. Durante esse período, Dr^a. Pieta estará sob minha orientação, receberá treinamento e conduzirá estudos pós-doutorais na área de infecção e virulência de *Salmonella*. Posso garantir que meu laboratório cobrirá todos os custos relacionados à pesquisa com este projeto durante a permanência da Dr^a. Pieta. Também posso afirmar que meu laboratório possui todas as instalações necessárias (nível de biossegurança 2) para apoiar o tipo de trabalho a ser realizado, bem como o acesso a outras instalações centrais e compartilhadas no Instituto e na Universidade, se necessário.

Será um prazer receber a Dr^a. Pieta no meu grupo de pesquisa e laboratório para o período de tempo designado.

Atenciosamente,

Marta Martins, PhD

Assistant Professor in Microbiology
Department of Microbiology,
Moyne Institute of Preventive Medicine,
School of Genetics and Microbiology,
Trinity College Dublin, the University of Dublin
Dublin 2, Ireland.
+353 1 896 1194
mmartins@tcd.ie
www.tcd.ie

Roinn na Micribhitheolaíochta
Institiúid Moyne um Leighceas Cúictheach
An Scoil Géineolaíochta agus
Micribhitheolaíochta
Coláiste na Tríonóide
Baile Átha Cliath 2, Éire

Department of Microbiology
The Moyne Institute of Preventive Medicine
School of Genetics and Microbiology
Trinity College Dublin
Dublin 2, Ireland

+353 1 896 1194
magoverj@tcd.ie/forsytc@tcd.ie
<http://www.tcd.ie/Microbiology/>



IFRS - INSTITUTO FEDERAL DE RESEARCH
 INSTITUTO FEDERAL DE RESEARCH
 INSTITUTO FEDERAL DE RESEARCH



NON-SALARIED Nomination for Appointment Form
ACCEPTED IN TYPED FORMAT ONLY

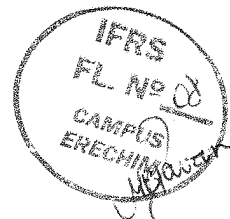
IMPORTANT NOTES:

- All forms must be typed and signed
- Incomplete or unsigned forms will be returned and will lead to delays.
- Completed forms, should be returned to your **School Administrative Manager**
- Use Academic titles document link to select suitable College title:
http://www.tcd.ie/hr/assets/pdf/Academic_Titles.pdf

Title of Post:	Visiting Research Fellow	School:	Genetics and Microbiology
		Discipline:	Microbiology
Workgroup: If this person will be a workgroup owner please specify the workgroup they will own		Is a new workgroup required?	NA
		Workgroup title:	NA
		Workgroup owner:	NA
Gender:	Female	Degrees or qualifications and awarding body for each qualification:	
Title (Mr/Ms/Dr/Prof etc.):	Dr.	PhD in Food Science and Technology (Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS)	
First name(s):	Luiza	MSc in Food Science and Technology (UFRGS)	
Surname:	Pieta	BSc in Food Engineering (UFRGS)	
Email:	luiza.pieta@erechim.ifrs.edu.br		
Phone No:	+55 51 99712-4190	Nationality:	Italian/Brazilian
Home Address:	25 Pedro Uriarte Filho St. 402, Erechim, RS, 99709-294, Brazil	Work Permit / Hosting Agreement required?	No
Date of Birth:	23 July 1986		
Commencement Date:	1 st March 2019	Termination date:	29 th February 2020
Additional Comments - specify exactly what research and/or teaching duties individual will be undertaking (this section must be completed):			
This researcher will be taking training at Post-Doctoral level at the research group in Antimicrobial Resistance and Host Modulation (P.I. Marta Martins) located at the Moyne Institute of Preventive Medicine. This will involve working in a microbiology laboratory under biosafety level 2 conditions. The researcher will be trained for specific techniques and/or areas, such as flow-cytometry, cell culture, infection assays, etc. Also, the researcher will be involved in the daily routine of the lab as well as in the lab meetings and presentations.			



Trinity College Dublin
 The University of Dublin



- Access to University computing resources and University data are provided to facilitate a visitor's work in Trinity College and/or for approved educational, training, or research purposes only.
- Visiting IT Users are solely responsible for ensuring that any username(s) and password(s) that they are granted remain confidential and are not used by unauthorised individuals.
- Visiting IT Users must not make unauthorised copies of University data or otherwise disclose University data to third parties without explicit permission from University authorities.
- On receipt of valid access credentials (username and password) all Visiting IT users are bound by the relevant University policies, procedure and codes of conduct as outlined below.
- A comprehensive list of University Policies is available at <https://www.tcd.ie/about/policies/>
- Of particular relevance to Visiting IT users are the following policies:
 - Cloud Computing Policy and Guidelines https://www.tcd.ie/about/policies/cloud_policy.php
 - Data Protection Policy https://www.tcd.ie/about/policies/data_protection.php
 - IT Security Policy https://www.tcd.ie/about/policies/it_security.php
 - IT And Network Code of Conduct https://www.tcd.ie/about/policies/it_and_network_code_of_conduct.php
 - Intellectual Property Policy https://www.tcd.ie/about/policies/assets/pdf/intellectual-property_policy.pdf
 - Records Management Policy https://www.tcd.ie/about/policies/records_management.php
 - Social Networking and Social Media Policy <https://www.tcd.ie/about/policies/social-networking-social-media.php>
 - College Web Polices <https://www.tcd.ie/webdesign/policies/>
 - Web facilities for Campus Companies https://www.tcd.ie/about/policies/web_facilities_for_campus_companies.php

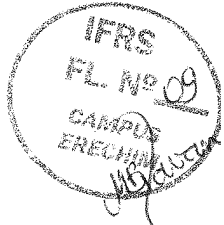
I confirm that I have read, understood and agreed to Trinity College Dublin's Policies.

Visitor Signature: 	PRINT NAME HERE LAURA PETA	DATE 16/10/2018
------------------------	-------------------------------	--------------------

Head of School/ Head of Administrative Area Signature: (Admin area relates to non-Faculty regions) (as appropriate) 	PRINT NAME HERE DAN BRADLEY	DATE 17/10/18
--	--------------------------------	------------------



...
...
...



Date: ____/____/____ Date of FEC Approval / Meeting: ____/____/____ (for Visiting Professor titles only)

Please supply Name, Extension No. and email of person who can be contacted by Human Resources if there are any queries regarding this form: Marta Martins (ext. 1194) (mmartins@tcd.ie)



(VERSÃO TRADUZIDA)

Termo de Compromisso - atuação NÃO ASSALARIADA

Título da atuação:	Pesquisador Visitante	Faculdade:	Genética e Microbiologia
		Área:	Microbiologia
Grupo de trabalho: Se essa pessoa for responsável por um grupo de trabalho, especifique o grupo e trabalho que estará sob sua responsabilidade		Se refere a um novo grupo de trabalho requerido?	Não se aplica
		Título do grupo de trabalho:	Não se aplica
		Responsável pelo grupo de trabalho:	Não se aplica
Gênero:	Feminino	Qualificações e instituição concedente de cada qualificação: Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS) Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS) Bacharelado em Engenharia de Alimentos (UFRGS)	
Titulação:	Doutora (Dr ^a .)		
Primeiro Nome:	Luiza		
Sobrenome:	Pieta		
E-mail:	luiza.pieta@erechim.ifrs.edu.br		
Número de telefone:	+55 51 99712-4190	Nacionalidade:	Brasileira e Italiana
Endereço Residencial:	Rua Pedro Uriarte Filho, nº 25 apartamento 402, Erechim, RS, CEP 99709-294, Brasil	Licença de Trabalho/Contrato de Hospedagem necessários?	Não
Data de Nascimento:	23 de julho de 1986		
Data de início das atividades:	1º de março de 2019	Data de finalização das atividades:	29 de fevereiro de 2020

Comentários adicionais - especifique exatamente quais tarefas de pesquisa e/ou ensino serão executadas (esta seção deve ser preenchida):

A pesquisadora estará realizando treinamento em nível de Pós-Doutorado no grupo de pesquisa sobre Resistência Antimicrobiana e Modulação do Hospedeiro (coordenado pela Professora Marta Martins) localizado no Instituto Moyne de Medicina Preventiva. Sua atuação envolverá trabalhar em um laboratório de microbiologia sob condições de biossegurança de nível 2. A pesquisadora será treinada para a realização de técnicas e/ou áreas específicas, tais como citometria de fluxo, cultura de células, testes de infecção, etc. Além disso, a pesquisadora estará envolvida na rotina diária do laboratório, bem como nas reuniões e apresentações do laboratório.



- O acesso a recursos de computação da Universidade e dados da Universidade é fornecido para facilitar o trabalho de um visitante na Trinity College e/ou para fins educacionais, de treinamento ou de pesquisa aprovados.
- Os visitantes usuários dos serviços de tecnologia da informação (TI) da Universidade são os únicos responsáveis por garantir que qualquer nome de usuário(s) e senha(s) a eles concedidos permaneçam confidenciais e não sejam utilizados por indivíduos não autorizados.
- Os visitantes usuários de TI não devem fazer cópias não autorizadas de dados da Universidade ou divulgar dados da Universidade a terceiros sem a permissão explícita das autoridades da Universidade.
- Ao receber credenciais de acesso válidas (nome de usuário e senha), todos os visitantes usuários de TI estão sujeitos às políticas, procedimentos e códigos de conduta da Universidade, conforme descrito abaixo.
- Uma lista abrangente das Políticas da Universidade está disponível em <https://www.tcd.ie/about/policies/>
- Políticas de particular relevância para os visitantes usuários de TI da Universidade:
 - Políticas e Diretrizes da Nuvem de Dados da Universidade <https://www.tcd.ie/about/policies/cloud-policy.php>
 - Política de Proteção de Dados https://www.tcd.ie/about/policies/data_protection.php
 - Política de segurança de TI https://www.tcd.ie/about/policies/it_security.php
 - Código de Conduta de TI e Rede https://www.tcd.ie/about/policies/it_and_network_code_of_conduct.php
 - Política de Propriedade Intelectual <https://www.tcd.ie/about/policies/assets/pdf/intellectual-property-policy.pdf>
 - Política de Gerenciamento de Registros https://www.tcd.ie/about/policies/records_management.php
 - Política de Redes Sociais e Mídias Sociais <https://www.tcd.ie/about/policies/social-networking-social-media.php>
 - Políticas de Internet da Universidade <https://www.tcd.ie/webdesign/policies/>
 - Instalações de Internet para Empresas do Campus https://www.tcd.ie/about/policies/web_facilities_for_campus_companies.php

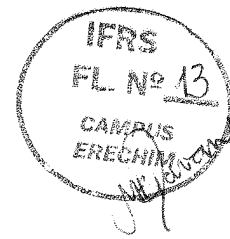
Confirmo que li, compreendi e concordei com as Políticas da Trinity College Dublin.



Assinatura do Visitante: <i>Luiza Pieta</i>	NOME POR EXTENSO LUIZA PIETA	DATA 16/10/2018
--	---------------------------------	--------------------

Assinatura do Diretor da Faculdade: <i>Dan Bradley</i>	NOME POR EXTENSO DAN BRADLEY	DATA 17/10/2018
---	---------------------------------	--------------------

Por favor, forneça o nome, o ramal e o e-mail da pessoa que pode ser contatada pelo Departamento de Recursos Humanos se houver alguma dúvida sobre este formulário: Marta Martins (ramal 1194) (mmartins@tcd.ie)



Research project to be carried out by Dr. Luiza Pieta

Location: Antimicrobial Resistance and Host Modulation Group, Moyne Institute of Preventive Medicine, School of Genetics and Microbiology, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

P.I. Dr. Marta Martins

Time frame: 1st March 2019 – 29th February 2020

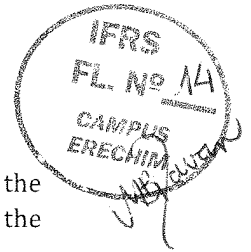
Project description, summary and main aims.

Title of the research project: Uncovering the anti-virulence potential of Thioridazine against *Salmonella* Typhimurium – novel strategies to fight MDR infections

The problem. The worldwide occurrence of antimicrobial resistance (AMR) is jeopardising our ability to treat infectious diseases and undermining advances in health and medicine. With very few new antibiotics coming in the pipeline, coupled with a rising on drug resistance for certain pathogens, unless action is taken, the burden of deaths from AMR could escalate to 10 million lives each year by 2050¹.

Background. Multidrug resistance is escalating in Gram-negative pathogens, such as *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., etc. The lack of new antibiotics to treat these and other infections triggered the search for not only novel molecules but also the drug repurposing of existing ones. This latter approach has been focusing on drugs commonly used for the therapy of non-infectious pathology². Examples of these drugs are phenothiazines, a group of heterocyclic compounds from which a big number of medically used compounds are derived. These compounds have been widely studied and their antibacterial activity reported: i) *in vitro* against *Salmonella*, *M. tuberculosis*, etc.; ii) *ex-vivo* in *M. tuberculosis* infected macrophages; and iii) *in vivo* by curing of mice infected with *Salmonella*. The activity of these compounds is postulated to be due to direct inhibition of bacterial replication; reduction of resistance of efflux-mediated MDR strains; enhanced killing of intracellular bacteria; inhibition of efflux pumps, etc³⁻⁵. However, some studies suggest that exposure of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis to the phenothiazine, Thioridazine (TZ) inhibits the activities of specific genes^{6,7}. Despite all these studies, the exact mechanism(s) by which these wide-ranging effects take place remain unexplained.

Previous studies. We have conducted studies in our lab related to the *in vitro* exposure of *Salmonella* to TZ. From these results, we can state that TZ is responsible for inducing changes in the gene response of the bacteria up to 1 hour after exposure to the compound. Several genes were downregulated in these conditions. Of particular relevance, *SicA*, a *Salmonella* Typhimurium type III secretion-associated chaperone showed a 129.1 fold-change after 30 minutes. This chaperone is encoded immediately upstream of the type III secreted proteins SipB and SipC. From our results SipB and SipC also showed similar fold changes after the same exposure to the compound. Additionally, the invasion protein, *InvF* showed an approximately 84 fold change after 1 hour of exposure to TZ. *InvF* is a transcriptional regulator required for the expression of several genes encoding type III secretion system SPI1 effector proteins and its interaction with *SicA* is necessary for the activation of *sigDE* (*sopB pipC*), *sicAsipBCDA*, and *sopE*. A number of other invasion genes were also downregulated, as well as a putative catalase.



Research question. The *in vitro* results, lead us to hypothesise if TZ is involved in the downregulation of *sicA* and *invF* and other virulence-related genes as well as in the expression of other relevant catalases.

Aims. To study the mode of action of TZ in bacteria internalised by human macrophages and epithelial cells using *Salmonella* Typhimurium as a model for infection. The main aims are to: (i) elucidate the *in vitro* effect of TZ on the expression of virulence and invasion-related genes in *Salmonella* Typhimurium (namely, *sicA* and *invF*) under SPI-1 and SPI-2 inducing conditions; (ii) assess the effect of TZ on the killing of *Salmonella* Typhimurium (wild type, *sicA* and *invF* mutants) phagocytosed by human macrophages and uptaken by epithelial cells; and (iii) conduct microscopy studies to evaluate the localisation of the bacteria (wild type and fusions) when internalised by the human cells.

Work to be conducted.

GFP fusions of *sicA* and *invF*. GFP-fusions will be constructed (if not available or can't be sourced) to assess the expression of *sicA* and *invF* in SPI-1 and -2 inducing conditions in the presence and absence of TZ.

Cell infection assays. The effect of TZ on the killing of *Salmonella* Typhimurium phagocytosed by human macrophages and uptaken by epithelial cells, will be initially assessed by colony forming units (CFU). The same protocol will be applied to the GFP fusions and flow cytometry assays will be conducted.

Production of reactive oxygen species (ROS). The possible effect of TZ on the activation of the infected cells will be evaluated by the production of nitrites/nitrates.

Immunofluorescence Staining. GFP-tagged *Salmonella* will be used to infect macrophages and epithelial cells. These cells will then be prepared for imaging.

References.

- ¹The Review on Antimicrobial Resistance. 2014. Chaired by Jim O'Neill. 20 pages.
- ²Xu *et al.* Combating multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014; 23:163-82.
- ³Amaral *et al.* Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. *In Vivo*. 2010, 24:409-24.
- ⁴Amaral *et al.* Phenothiazines as anti-multi-drug resistant tubercular agents. *Infectious Disorders - Drug Targets* 2007, 7:257-265.
- ⁵Machado *et al.* Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2016 26;11:e0149326.
- ⁶Thorsing *et al.* Thioridazine induces major changes in global gene expression and cell wall composition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *PLoS One* 2013 17;8:e64518.
- ⁷Spengler *et al.* Genetic response of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to thioridazine rendering the organism resistant to the agent. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:16-21.



Projeto de pesquisa a ser desenvolvido pela Dr^a. Luiza Pieta (VERSÃO TRADUZIDA)

Local de Realização: Grupo de pesquisa sobre Resistência Antimicrobiana e Modulação do Hospedeiro, Instituto Moyne de Medicina Preventiva, Faculdade de Genética e Microbiologia, Trinity College Dublin, Dublin 2, Irlanda

Coordenadora do grupo de pesquisa Dr^a. Marta Martins

Período: 1º de março de 2019 a 29 de fevereiro de 2020

Descrição do projeto, resumo e principais objetivos.

Título do projeto de pesquisa: Descobrimo o potencial anti-virulência da tioridazina contra *Salmonella* Typhimurium - novas estratégias para combater infecções por bactérias multirresistentes (MDR)

O problema. A ocorrência mundial de resistência antimicrobiana (*antimicrobial resistance*; AMR) está colocando em risco nossa capacidade de tratar doenças infecciosas, prejudicando os avanços em saúde e medicina. Devido ao lançamento de muito poucos novos antibióticos e ao aumento da resistência aos medicamentos por certos patógenos, a menos que sejam tomadas medidas, o ônus das mortes por AMR pode aumentar para 10 milhões de vidas a cada ano até 2050¹.

Contexto. A resistência a múltiplas drogas por patógenos Gram-negativos, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., etc, vem aumentando gradativamente. A falta de novos antibióticos para tratar essas e outras infecções desencadeou a busca não apenas por novas moléculas, mas também pelo reaproveitamento de drogas já existentes. Esta última abordagem tem se concentrado nas drogas comumente usadas para a terapia de patologias não infecciosas². Exemplos destas drogas são as fenotiazinas, um grupo de compostos heterocíclicos dos quais um grande número de compostos usados pela medicina são derivados. Estes compostos têm sido amplamente estudados e sua atividade antibacteriana relatada: i) *in vitro* contra *Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc; ii) *ex vivo* em macrófagos infectados por *M. tuberculosis*; e iii) *in vivo* através da cura de camundongos infectados com *Salmonella*. Acredita-se que a atividade desses compostos esteja relacionada à inibição direta da replicação bacteriana; à redução da resistência de cepas MDR mediadas por efluxo; ao aumento da morte de bactérias intracelulares; à inibição de bombas de efluxo, etc³⁻⁵. Entretanto, alguns estudos sugerem que a exposição de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis à fenotiazina tioridazina (TZ) inibe as atividades de genes específicos^{6,7}. Apesar de todos esses estudos, o mecanismo exato pelo qual a droga possui esse amplo espectro de ação segue pouco esclarecido.

Estudos anteriores. Realizamos previamente estudos em nosso laboratório relacionados à exposição *in vitro* de *Salmonella* a TZ. A partir desses resultados, podemos afirmar que a TZ é responsável por induzir mudanças na resposta gênica da bactéria até 1 hora após a exposição ao composto. Vários genes foram regulados negativamente nessas condições. De particular relevância, a SicA, uma chaperona associada à secreção de *Salmonella* Typhimurium tipo III, apresentou uma alteração na sua expressão de 129,1 vezes após 30 minutos. Esta chaperona é codificada imediatamente a montante das proteínas secretadas do tipo III, SipB e SipC. A partir dos nossos resultados, SipB e SipC também mostraram variações na sua expressão semelhantes após a exposição ao mesmo composto. Adicionalmente, a proteína de invasão, InvF, mostrou uma alteração na sua expressão de aproximadamente 84 vezes após 1 hora de exposição a TZ. InvF é um regulador transcricional necessário para a expressão de vários genes que codificam as proteínas efetoras SPI1 do sistema de secreção tipo III e sua interação com SicA é necessária para a ativação de *sigDE* (*sopB pipC*), *sicAsipBCDA* e *sopE*. Outros genes de invasão também foram regulados negativamente, bem como uma catalase putativa.



Questão da pesquisa. Os resultados *in vitro* levam-nos a hipotetizar se a TZ está envolvida na regulação negativa de *sicA* e *invF* e de outros genes relacionados com a virulência, bem como na expressão de outras catalases relevantes.

Objetivos. Estudar o modo de ação da TZ em bactérias internalizadas por macrófagos humanos e células epiteliais usando *Salmonella Typhimurium* como modelo para infecção. Os principais objetivos são: (i) elucidar o efeito *in vitro* da TZ na expressão de genes de virulência e de genes relacionados à invasão em *Salmonella Typhimurium* (a saber, *sicA* e *invF*) sob condições indutoras de SPI-1 e SPI-2; (ii) avaliar o efeito de TZ na morte de *Salmonella Typhimurium* (cepa do tipo selvagem, *sicA* e *invF* mutantes) fagocitada por macrófagos humanos e captada por células epiteliais; e (iii) realizar estudos de microscopia para avaliar a localização das bactérias (tipo selvagem e fusões) quando internalizadas pelas células humanas.

Trabalho a ser realizado.

Fusões GFP de *sicA* e *invF*. As fusões GFP serão construídas (se não estiverem disponíveis ou não puderem ser obtidas) para avaliar a expressão de *sicA* e *invF* nas condições indutoras de SPI-1 e -2 na presença e ausência de TZ.

Ensaio de infecção celular. O efeito da TZ na morte de *Salmonella Typhimurium*, fagocitada por macrófagos humanos e captada por células epiteliais, será avaliado inicialmente por unidades formadoras de colônia (UFC). O mesmo protocolo será aplicado às fusões GFP. Ainda, ensaios de citometria de fluxo serão realizados.

Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs; ROS). O possível efeito da TZ na ativação das células infectadas será avaliado pela produção de nitritos/nitratos.

Ensaio de Imunofluorescência. *Salmonella* marcada com GFP será usada para infectar macrófagos e células epiteliais, e as células então preparadas para a geração de imagens.

Referências.

- ¹The Review on Antimicrobial Resistance. 2014. Chaired by Jim O'Neill. 20 pages.
- ²Xu *et al.* Combating multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014; 23:163-82.
- ³Amaral *et al.* Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. *In Vivo*. 2010, 24:409-24.
- ⁴Amaral *et al.* Phenothiazines as anti-multi-drug resistant tubercular agents. *Infectious Disorders - Drug Targets* 2007, 7:257-265.
- ⁵Machado *et al.* Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2016 26;11:e0149326.
- ⁶Thorsing *et al.* Thioridazine induces major changes in global gene expression and cell wall composition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *PLoS One* 2013 17;8:e64518.
- ⁷Spengler *et al.* Genetic response of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to thioridazine rendering the organism resistant to the agent. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:16-2



FORMULÁRIO-SÍNTESE DA PROPOSTA - SIPES
EDITAL EDITAL 01/2018 _ FLUXO CONTÍNUO - PROJETOS DE PESQUISA E/OU
INOVAÇÃO DESENVOLVIDOS POR SERVIDORES DO IFRS EM CURSOS DE
PÓS-GRADUAÇÃO Lato Sensu, PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO Stricto Sensu OU

PROCESSO Nº: DOUTORADO
SIPES Nº: 315679.1645.271360.28102018

1. Introdução

1.1 Identificação da Proposta

Título: Descobrimo o potencial anti-virulência da tioridazina contra Salmonella Typhimurium - novas estratégias para combater infecções por bactérias multirresistentes (MDR)

Coordenador: Luiza Pieta / Docente

Tipo da Proposta: Projeto Institucional

Edital: EDITAL 01/2018 _ FLUXO CONTÍNUO - PROJETOS DE PESQUISA E/OU

Instituição: IFRS - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

Unidade Geral: Erechim - Câmpus Erechim - Pesquisa

Unidade de Origem: P&i - Pesquisa e Inovação

Início Previsto: 01/03/2019

Término Previsto: 29/02/2020

Possui Recurso Financeiro: Não

1.2 Detalhes da Proposta

Natureza do Projeto: Aplicada

Área de Conhecimento: Ciências Agrárias » Ciência e Tecnologia de Alimentos » Ciência de Alimentos » Microbiologia de Alimentos

Grupo de Pesquisa no CNPq: Alimentos, Energia e Saúde

Linha de Pesquisa: Processos biotecnológicos

Parecer do Comitê de Ética: Não

Local de Realização: O projeto trata-se de pesquisa a nível de pós-doutorado a ser realizada sob orientação da Profª. Drª. Marta Martins, coordenadora do grupo de pesquisa sobre Resistência Antimicrobiana e

1.3 Parcerias

Nome	Sigla	Parceria	Tipo de Instituição/IPES	Participação
Trinity College Dublin	TCD	Externa à IES	Outros	A pesquisa a nível de pós-doutorado será realizada nas dependências da Trinity College Dublin, mais especificadamente na Faculdade de Genética e Microbiologia da Universidade - Departamento de Microbiologia.

1.4 Descrição da Proposta

Resumo da Proposta:

A ocorrência mundial de resistência antimicrobiana (antimicrobial resistance; AMR) está colocando em risco nossa capacidade de tratar doenças infecciosas, prejudicando os avanços em saúde e medicina. Devido ao lançamento de poucos novos antibióticos e ao aumento da resistência aos medicamentos por certos patógenos, o ônus das mortes por AMR pode aumentar para 10 milhões de vidas a cada ano até 2050. A resistência a múltiplas drogas por patógenos Gram-negativos, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Salmonella spp.*, vem aumentando gradativamente. Estudos referentes a resistência a antibióticos em espécies de *Salmonella*, importante causadora de infecções e gastroenterites através da ingestão de alimentos contaminados, são de importante relevância nas áreas de Microbiologia Médica e de Alimentos. A falta de novos antibióticos para tratar infecções bacterianas desencadeou a busca não apenas por novas moléculas, mas também pelo reaproveitamento de drogas já existentes, tais como as fenotiazinas. Um grande número de compostos usados pela medicina são derivados destas drogas, consideradas compostos heterocíclicos que têm sido amplamente estudados devido a sua atividade antibacteriana. Estudos sugerem que a exposição de importantes patógenos alimentares tais como *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis/Typhimurium e *Staphylococcus aureus* à droga fenotiazina do tipo tioridazina (TZ) regula negativamente a atividade de genes específicos relacionados a virulência destes microrganismos. Dessa forma, se faz necessária a realização de novas pesquisas a fim de investigar o modo de ação de TZ sobre bactérias causadoras de infecções, que em muitos casos levam os indivíduos a óbito.

Palavras-Chave:

Salmonella spp., saúde pública, resistência antimicrobiana, tioridazina, virulência

Informações Relevantes para Avaliação da Proposta:

O uso incorreto dos antibióticos vem de encontro ao desenvolvimento das chamadas 'superbactérias', que resistem a diferentes compostos antimicrobianos e causam grande preocupação principalmente nos ambientes hospitalares. Em função da baixa quantidade de novas drogas que vem sendo desenvolvidas para combater os processos infecciosos, uma alternativa vem sendo a retomada de estudos envolvendo

drogas mais antigas. Alguns cientistas estão recorrendo também ao conhecimento do passado, defendendo inclusive a utilização de técnicas da Idade Média para diminuir o uso de antibióticos desenvolvidos em laboratório, no combate ao crescimento de microrganismos que resistem a tratamentos mais modernos. É preciso a busca por alternativas que impeçam o aumento da resistência antimicrobiana e a morte de pessoas por infecções simples, que estão se tornando cada vez mais intratáveis.

1.4.1 Justificativa

A resistência antimicrobiana (antimicrobial resistance; AMR), isto é, a pandemia de patógenos multirresistentes MDR (multidrug resistance; MDR) a medicamentos, é uma séria ameaça à saúde pública global. Em função disso, em 2015 a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou um plano de ação global sobre a AMR e lançou o Sistema Global de Vigilância da Resistência Antimicrobiana (GLASS) (OMS, 2015). O GLASS promove e apóia uma abordagem padronizada para a coleta, análise e compartilhamento de dados de AMR a nível global, incentivando e facilitando o estabelecimento de sistemas nacionais de vigilância que sejam capazes de monitorar tendências de AMR e produzir dados confiáveis e comparáveis.

Dados do Centro de Prevenção e Controle de Doenças americano (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) relatam mais de dois milhões de casos de infecções causadas por bactérias MDR nos Estados Unidos, que resultaram em aproximadamente 23.000 mortes (CDC, 2012). Ainda, o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC), a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (European Food Safety Authority; EFSA) e a Agência Europeia de Medicamentos (European Medicines Agency; EMA) identificaram um aumento nas taxas de mortalidade associadas a infecções causadas por bactérias MDR principalmente na Ásia e na África (De Beer et al., 2014).

O ambiente, os seres humanos e os animais desempenham um papel importante no surgimento e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos. Em 2007, a OMS convocou todos os países membros a promover o uso racional de antibióticos para evitar a disseminação da resistência antimicrobiana, porém, a falta de um protocolo abrangente de manejo englobando animais, alimentos, práticas de higiene pública e monitoramento de ambientes naturais resultou no fracasso do controle do surgimento de bactérias MDR (OMS, 2007).

A septicemia é uma condição médica grave em que as bactérias presentes no sistema circulatório provocam uma resposta imune amplificada e desregulada no indivíduo (Gaydelite et al., 2007). Grande parte destas infecções são causadas por bacilos Gram-negativos frequentemente encontrados em ambientes hospitalares, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Wattal e Oberoi (2016) descreveram uma ampla gama de bacilos Gram-negativos em alta proporção em hemoculturas de pacientes diagnosticados com septicemia. A rápida intervenção antibiótica é considerada atualmente a única maneira de se tratar a septicemia. Porém, devido a prática da administração inadequada dos antibióticos, cada vez mais as bactérias se tornam resistentes a estes medicamentos.

Bacilos Gram-negativos possuem resistência de alto nível descrita a muitos antibióticos amplamente utilizados, tais como betalactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos e até mesmo carbapenêmicos. Na Etiópia, estudos relataram a prevalência de betalactamases de amplo espectro (Extended-spectrum betalactamases; ESBL) em 25 a 38,5% de Enterobacteriaceae (enterobactérias presentes no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, tais como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.) de amostras clínicas obtidas de vários hospitais (Mulisa et al., 2016; Siraj et al., 2014). Uma rápida disseminação de genes de resistência a antibióticos ocorre por transferência horizontal entre bactérias, sendo esta uma das principais causas da emergente preocupação com bacilos Gram-negativos MDR (Rui et al., 2018).

1.4.2 Fundamentação Teórica

1.4.2.1 Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é composta por uma ampla variedade de bacilos Gram-negativos, em grande parte patogênicos, que pertencem a microbiota normal gastrointestinal de seres humanos e animais. Alguns exemplos destes microrganismos são *Escherichia coli* e bactérias pertencentes aos gêneros *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* e *Yersinia*. As enterobactérias são frequentemente encontradas em hospitais, sendo espécies resistentes a drogas antimicrobianas as principais causadoras de infecções nestes ambientes. A resistência bacteriana é um problema frequente e importante no ambiente hospitalar, e o aumento da resistência entre os membros da família Enterobacteriaceae tem se mostrado um importante problema de saúde pública em expansão (Patel et al., 2009).

1.4.2.1.1 *Salmonella* spp.

Salmonella é um gênero de bactérias Gram-negativas encontradas naturalmente no trato gastrointestinal do homem e dos animais de sangue quente. Possuem forma de bacilo, sendo na sua maioria móveis por flagelos peritríquios, além de serem não esporuladas e não capsuladas. O gênero é composto por três espécies, *Salmonella subterranea*, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última a mais relevante a nível de gastroenterites de origem alimentar, um dos problemas mais alarmantes de saúde pública em todo o mundo.

Dentre as espécies de maior relevância para a saúde humana destacam-se *Salmonella enterica* dos sorovares Typhi, causadora de febre tifoide; e dos sorovares Typhimurium e Enteritidis, causadoras de gastroenterites. Na Europa, por exemplo, os sorovares Typhimurium e Enteritidis foram os responsáveis pela maioria dos casos de salmonelose humana em 2011 (EFSA, 2014). Algo que corrobora com estes dados refere-se a resistência a antibióticos que tais bactérias possuem. A salmonelose entérica impõe um grande ônus à saúde pública em países subdesenvolvidos e industrializados, pois estima-se que anualmente 93,8 milhões de casos de gastroenterite por *Salmonella* não tifoide e 155.000 casos de mortalidade ocorram em todo o mundo (Ao et al., 2015; Kirk et al., 2010; Majowicz et al., 2010). Casos graves de salmonelose são causados por contaminação cruzada de alimentos com matéria fecal de animais infectados, transmissão fecal-oral de seres humanos infectados ou pela contaminação de fontes ambientais ou de outros alimentos (de Freitas et al., 2010; EFSA, 2014).

1.4.2.2 Bactérias multirresistentes (MDR)

Bactérias multirresistentes são aquelas que possuem elevada resistência antimicrobiana, isto é, que resistem aos efeitos das drogas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas. Uma grande quantidade de prescrições médicas de antimicrobianos não são necessárias, ou tem dosagem ou duração incorreta. Assim, o uso sem controle e indiscriminado destes medicamentos tem aumentado a resistência de microrganismos patogênicos.

Entre as bactérias Gram-negativas, a produção de betalactamases é a principal forma de resistência bacteriana aos antimicrobianos betalactâmicos. Estas enzimas promovem a degradação do anel betalactâmico, inativando assim o composto antimicrobiano e impedindo sua ação contra os microrganismos. Entre as betalactamases, os grupos mais preocupantes, atualmente, são as betalactamases de aspecto ampliado e as carbapenemases (Alves e Behar, 2013).

Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase (CPE) têm sido crescentemente notificadas em todo o mundo nos últimos anos, sendo causadoras de infecções graves em pacientes imunocomprometidos, com opções limitadas de tratamento (Banerjee et al. 2017; Tamma et al., 2017). Ainda, as espécies produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) estão se tornando endêmicas em muitas partes do mundo, uma vez que as infecções causadas por tais bactérias aumentaram significativamente na última década (Luvsansharav et al., 2012; Zhong et al., 2015).

séptica e mortalidade. O reposicionamento de drogas (também conhecido como reaproveitamento de drogas, redefinição de perfil, redistribuição ou troca terapêutica) é a aplicação de drogas e compostos conhecidos para tratar uma doença diferente.

Como as demais drogas do grupo das fenotiazinas, a tioridazina também possui ação antipsicótica largamente conhecida e estudada. Mais recentemente foi descrita a sua seletividade para células cancerígenas, uma vez que tratamentos *in vitro* testando progenitores leucêmicos contra progenitores hematopoiéticos saudáveis com tioridazina levaram à supressão do crescimento clonogênico e da capacidade de iniciar a doença leucêmica em células de leucemia primitiva (Sachlos et al., 2012).

1.4.3 Objetivos

Objetivo Geral:

Estudar o modo de ação da tioridazina em bactérias internalizadas por macrófagos humanos e células epiteliais usando *Salmonella Typhimurium* como modelo para infecção.

Objetivos Específicos:

- Elucidar o efeito *in vitro* da tioridazina na expressão de genes de virulência e de genes relacionados à invasão em *Salmonella Typhimurium* (a saber, *sicA* e *invF*) sob condições indutoras de SPI-1 e SPI-2;
- Avaliar o efeito de tioridazina na morte de *Salmonella Typhimurium* (cepa do tipo selvagem, *sicA* e *invF* mutantes) fagocitada por macrófagos humanos e captada por células epiteliais;
- Realizar estudos de microscopia para avaliar a localização das bactérias (tipo selvagem e fusões) quando internalizadas pelas células humanas.

1.4.4 Metodologia e Avaliação

1) Fusões GFP de *sicA* e *invF*

O método de localização de proteínas através da visualização de estruturas celulares utilizando fluorescência tem sido empregado com sucesso na investigação da funcionalidade de genes, fazendo uso de um gene marcador de fácil análise em tecidos vivos. O gene *gfp* foi isolado a partir da água-viva *Aequorea victoria*, que atua através de uma enzima bioluminescente, a proteína verde fluorescente (GFP), a qual confere a este organismo a propriedade de luminescência verde. A introdução deste cromóforo através de uma sequência genética, combinada com métodos de alta sensibilidade e resolução da microscopia de fluorescência, tem possibilitado à GFP sua aplicação em uma ampla gama de estudos biológicos.

Na presente pesquisa, as fusões GFP serão construídas (se não estiverem disponíveis ou não puderem ser obtidas) para avaliar a expressão de *sicA* e *invF* nas condições indutoras de SPI-1 e -2 na presença e ausência de tioridazina.

2) Ensaios de infecção celular

O efeito da tioridazina na morte de *Salmonella Typhimurium*, fagocitada por macrófagos humanos e captada por células epiteliais, será avaliado inicialmente por unidades formadoras de colônia (UFC). O mesmo protocolo será aplicado às fusões GFP. Ainda, serão realizados ensaios de citometria de fluxo para análise de células ou partículas suspensas no meio líquido investigado.

3) Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO; ROS)

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, produzindo radicais livres de forma natural ou por uma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio). No organismo, estão envolvidos na produção de

energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas, entretanto, quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Barreiros et al., 2006; de Oliveira e Schoffen, 2010).

A produção de ERO é elevada nas lesões teciduais causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, devido a um conjunto de processos como o aumento de enzimas envolvidas na formação de radicais, a ativação da fagocitose, liberação de ferro e cobre ou a interrupção da cadeia transportadora de elétrons (Rock et al., 1996).

Dentre as principais ERN incluem-se o óxido nítrico, óxido nitroso, ácido nitroso, nitritos, nitratos e peroxinitritos. O radical óxido nítrico pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintetase a partir de arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP⁺ e citrulina. O nitrato pode transformar-se em nitrito, que reage com os ácidos gástricos gerando o ácido nitroso. O ácido nitroso promove a desaminação das bases do DNA que contêm o grupo -NH₂ livre, que são citosina, adenina e guanina, formando-se uracila, hipoxantina e xantina (Barreiros et al., 2006).

Dessa forma, o possível efeito da tioridazina na ativação das células infectadas será avaliado pela produção de nitritos/nitratos.

4) Ensaios de Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência baseiam-se na utilização de antígenos ou anticorpos conjugados a moléculas reveladoras denominadas fluorocromos, que são corantes que absorvem radiação (luz ultravioleta), são por ela excitados e emitem em decorrência disso luz visível.

Nos ensaios do presente estudo, *Salmonella* marcada com GFP será usada para infectar macrófagos e células epiteliais, e as células então preparadas para a geração de imagens a serem visualizadas em microscópio de fluorescência.

1.4.5 Referências Bibliográficas

Alves AP, Behar PR. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. *Rev AMRIGS*. 2013; 57(3):213-218.

Ao TT, Feasey NA, Gordon MA, Keddy KH, Angulo FJ, Crump JA. Global Burden of Invasive Nontyphoidal *Salmonella* Disease, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(6):941-949.

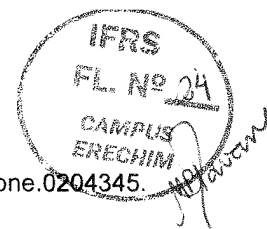
Asif M. Antipsychotic agents. Pharmacological activities of compounds containing arylpiperazines. *IJCRCCE*. 2016; 2:1-30.

Baig MS, Roy A, Saqib U, Rajpoot S, Srivastava M, Naim A, Liu D, Saluja R, Faisal SM, Pan Q, Turkowski K, Darwhekar GN, Savai R. Repurposing Thioridazine (TDZ) as an anti-inflammatory agent. *Sci Rep*. 2018; 8(1):12471. doi: 10.1038/s41598-018-30763-5.

Banerjee R, Humphries R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017; 8:427-439.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006; 29(1):113-123.

Beshiru A, Igbinosa IH, Igbinosa EO. Biofilm formation and potential virulence factors of *Salmonella* strains



isolated from ready-to-eat shrimps. PLoS One. 2018;13(9):e0204345. doi: 10.1371/journal.pone.0204345.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Active bacterial core surveillance methodology. 2012.

Darwin KH, Miller VL. Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. EMBO. 2001; 20:1850–1862.

De Beer JL, Kodmon C, Van der Werf MJ, Van Ingen J, Van Soolingen D, ECDC MDR-TB Molecular Surveillance Project Participants. Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011. Eurosurveillance. 2014; 19(11):pii20742

de Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, Barrow P, Berchieri Junior A. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. Rev Bras Cienc Avic. 2010; 12:01–11.

de Oliveira MC, Schoffen JPF. Oxidative stress action in cellular aging. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2010; 53(6):1333-1342.

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. EFSA Journal. 2014; 12:3547.

Gaidelyte A, Vaara M, Bamford DH. Bacteria, phages and septicemia. PLoS One. 2007; 2(11):e1145.

Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. Nature. 2006; 444: 567–573.

Kaniga K, Tucker S, Trollinger D, Galan JE. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. J Bacteriol. 1995; 177: 3965–3971.

Kim W, Killam T, Sood V, Surette MG. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* results in elevated resistance to multiple antibiotics. J Bacteriol. 2003; 185:3111–3117.

Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. PLoS Med. 2015; pmid:26633831.

Lee CA, Silva M, Siber AM, Kelly AJ, Galyov E, McCormick BA. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; 97(22):12283–12288.

Luvansharav UO, Hirai I, Nakata A, Imura K, Yamauchi K, Niki M, et al. Prevalence of and risk factors associated with faecal carriage of CTX-M beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in rural Thai communities. J Antimicrob Chemother. 2012; 67:1769–1774.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ et al. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010; 50:882–889.

McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D & Koronakis. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. Curr Opin Microbiol. 2009; 12:117–124.

Morak-Odawaska B, Jele M. New biological properties of neuroleptic phenothiazines. Pol Merkur Lekarski. 2007; 23:459–461.

Mulisa G, Selassie L, Jarso G, Shiferew T, Zewdu A. Prevalence of extended Spectrum Beta-lactamase producing Enterobacteriaceae: a cross sectional study at Adama hospital, Adama, Ethiopia. *J Emerg Infect Dis.* 2016; 1(102):2.

Organização Mundial da Saúde (OMS). World Health Assembly Resolutions: 51.17/1998, emerging and other communicable diseases: antimicrobial resistance; 58.27/2005 improving the containment of antimicrobial resistance; 60.16/ Progress in the Rational Use of Medicines, Including Better Medicines for Children, Geneva, Switzerland: WHO, 2007.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: WHO; 2015. Disponível em <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>

Otręba M, Beberok A, Wrześniok D, Buszman E. In vitro melanogenesis inhibition by fluphenazine and prochlorperazine in normal human melanocytes lightly pigmented. *Daru.* 2018; 26(1):85-89. doi: 10.1007/s40199-018-0206-4.

Patel JB, Rasheed JK, BrandonKitchel MS. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology and laboratory detection. *Clin Microb News.* 2009; 31(8):55-62.

Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S, et al. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 Contribute to Salmonella enterica Serotype Typhimurium Invasion of Epithelial Cells. *Infection and immunity.* 2005; 73(1):146–154.

Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association.* 1996; 96:693-702.

Rui Y, Lu W, Li S, Cheng C, Sun J, Yang Q. Detection of common mobile genetic elements and genotyping of multidrug-resistant Gram-negative bacilli in blood specimens from septicemia patients in southern China. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1741-1750. doi: 10.2147/IDR.S165513.

Sachlos E, Risueño RM, Laronde S, Shapovalova Z, Lee JH, Russell J, Malig M, McNicol JD, Fiebig-Comyn A, Graham M, Levadoux-Martin M, Lee JB, Giacomelli AO, Hassell JA, Fischer-Russell D, Trus MR, Foley R, Leber B, Xenocostas A, Brown ED, Collins TJ, Bhatia M. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell.* 2012; 149(6):1284-1297.

Sharma M, Anand SK. Swarming: A coordinated bacterial activity. *Curr Sci.* 2002; 83:707–715.

Siraj SM, Ali S, Wondafrash B. Extended-spectrum-lactamase production and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli among inpatients and outpatients of Jimma University specialized hospital, south-west, Ethiopia. *Afr J Microbiol Res.* 2014; 8(43):3687–3694.

Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, Tekle T, Roberts A, Taiwo A, Simner PJ. Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2017; 64:257–264.

Tucker SC, Galan JE. Complex function for SicA, a Salmonella enterica serovar typhimurium type III secretion‐associated chaperone. *J Bacteriol.* 2000; 182: 2262–2268.

Wattal C, Oberoi JK. Microbial identification and automated antibiotic susceptibility testing directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS and VITEK 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016; 35(1):75–82.

Zhang S, Santos RL, Tsois RM, Stender S, Hardt W-D, Bäumlér AJ, et al. The Salmonella enterica Serotype Typhimurium Effector Proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 Act in Concert To Induce Diarrhea in Calves. Infect Immun. 2002; 70(7):3843–3855.

Zhong YM, Liu WE, Liang XH, Li YM, Jian ZJ, Hawkey PM. Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing Escherichia coli in healthy individuals in Hunan Province, China. J Antimicrob Chemother. 2015; 70: 2223–2227.

1.4.6 Observações

O presente projeto relaciona três áreas distintas (Ensino, Pesquisa e Extensão), mas que se complementam e auxiliam na formação de estudantes e profissionais.

No âmbito do Ensino, por se tratar de estudos a nível de pós-doutorado, que auxiliarão no aprendizado de novas técnicas e complementação do conhecimento da estudante na sua área de atuação.

Em relação a Extensão, faz-se necessária a externalização de dados importantes obtidos durante a realização do trabalho para a comunidade acadêmica e científica, principalmente pela realização de palestras em eventos da área.

Por tratar-se de um projeto de Pesquisa, a sua realização possibilita a divulgação dos resultados através da publicação de artigos científicos e apresentação de partes do trabalho em congressos nacionais e internacionais.

1.5 Outros Produtos Acadêmicos

Gera Produtos:	Sim
Produtos:	Artigo Completo Pôster Resumo (Anais)
Descrição/Tiragem:	Existe o interesse na publicação de artigo científico relacionado aos experimentos realizados no projeto, além da divulgação da pesquisa em congressos e simpósios, pela publicação de resumos e/ou apresentação de trabalho (forma oral ou pôster).

1.6 Anexos

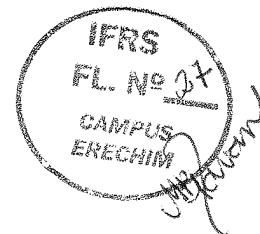
Não há nenhum anexo

2. Equipe de Execução

2.1 Membros da Equipe de Execução

Docentes da IFRS

Nome	Regime - Contrato	Instituição	CH Total	Funções
Luiza Pieta	Dedicação exclusiva	IFRS	1223 hrs	Coordenador, Pesquisador(a)



Discentes da IFRS

Não existem Discentes na sua atividade

Técnico-administrativo da IFRS

Não existem Técnicos na sua atividade

Outros membros externos a IFRS

Nome	Instituição	Carga	Função
Marta Martins	Trinity College Dublin	260 hrs	Pesquisador(a)

Coordenador:

Nome: Luiza Pieta

RGA: -----

CPF: 01138674095

Email: luiza.pieta@erechim.ifrs.edu.br

Categoria: Professor Assistente

Fone/Contato: 51997124190

2.2 Cronograma de Atividades

Atividade: Cultivo das culturas bacterianas
Início: Mar/2019 **Duração:** 9 Meses
Somatório da carga horária dos membros: 3 Horas/Mês
Carga Horária Semanal: 0.8 Horas
Responsável: Luiza Pieta (C.H. 3 horas/Mês)

Atividade: Elaboração de artigos científicos e resumos para apresentação em congressos
Início: Set/2019 **Duração:** 6 Meses
Somatório da carga horária dos membros: 32 Horas/Mês
Carga Horária Semanal: 8 Horas
Responsável: Luiza Pieta (C.H. 24 horas/Mês)
Membro Vinculado: Marta Martins (C.H. 8 horas/Mês)

Atividade: Ensaios de imunofluorescência
Início: Mai/2019 **Duração:** 7 Meses
Somatório da carga horária dos membros: 30 Horas/Mês
Carga Horária Semanal: 7.5 Horas
Responsável: Luiza Pieta (C.H. 24 horas/Mês)
Membro Vinculado: Marta Martins (C.H. 6 horas/Mês)

Atividade: Ensaios de infecção celular
Início: Mai/2019 **Duração:** 7 Meses
Somatório da carga horária dos membros: 38 Horas/Mês
Carga Horária Semanal: 9.5 Horas
Responsável: Luiza Pieta (C.H. 28 horas/Mês)
Membro Vinculado: Marta Martins (C.H. 10 horas/Mês)

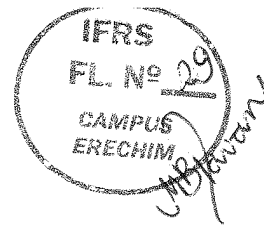
Atividade: Fusões GFP de sicA e invF
Início: Abr/2019 **Duração:** 8 Meses
Somatório da carga horária dos membros: 40 Horas/Mês
Carga Horária Semanal: 10 Horas
Responsável: Luiza Pieta (C.H. 32 horas/Mês)
Membro Vinculado: Marta Martins (C.H. 8 horas/Mês)

Atividade: Produção de espécies reativas de oxigênio
Início: Jun/2019 **Duração:** 6 Meses
Somatório da carga horária dos membros: 30 Horas/Mês
Carga Horária Semanal: 7.5 Horas
Responsável: Luiza Pieta (C.H. 24 horas/Mês)
Membro Vinculado: Marta Martins (C.H. 6 horas/Mês)

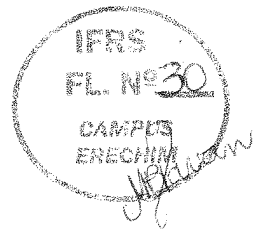
Atividade: Revisão Bibliográfica
Início: Mar/2019 **Duração:** 12 Meses
Somatório da carga horária dos membros: 24 Horas/Mês
Carga Horária Semanal: 6 Horas
Responsável: Luiza Pieta (C.H. 24 horas/Mês)

Responsável	Atividade	2019											
		Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Luiza Pieta	Cultivo das culturas bacterianas	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
Luiza Pieta	Revisão Bibliográfica	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Luiza Pieta	Fusões GFP de sicA e invF	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-
Luiza Pieta	Ensaio de imunofluorescência	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	-
Luiza Pieta	Ensaio de infecção celular	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	-
Luiza Pieta	Produção de espécies reativas de oxigênio	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	-
Luiza Pieta	Elaboração de artigos científicos e resumos...	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X

Responsável	Atividade	2020											
		Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Luiza Pieta	Revisão Bibliográfica	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Luiza Pieta	Elaboração de artigos científicos e resumos...	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Erechim / RS , 28/10/2018 Luiza Pieta
Local **Luiza Pieta**
Coordenador(a) da Proposta de Pesquisa



Ministério da Educação
 Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
 Campus Erechim

CURSO TÉCNICO EM ALIMENTOS/ENGENHARIA DE ALIMENTOS
ATA Nº14/2018

1 Aos vinte e um dias do mês de novembro de dois mil e dezoito, às treze horas e quarenta e cinco minutos,
 2 na Sala 304 do Bloco três do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Campus Erechim, realizou-se reunião
 3 com a participação de Aline Maria Cenci, Andressa Sausen de Freitas, Cristiane Reinaldo Lisboa,
 4 Guilherme Barcellos de Moura, Leonardo Souza da Rosa, Luiza Pieta, Marília Assunta Sfredo, Marlice
 5 Salete Bonacina, Priscilla Pereira dos Santos, Toni Luis Benazzi, Valeria Valeria Borszcz e Wagner Luiz
 6 Priamo. A seguinte pauta foi discutida: 1) Horário 2019/1; 2) Afastamento da professora Luíza. 1) A
 7 professora Cristiane iniciou a reunião apresentando a planilha de horários contendo as informações do
 8 núcleo comum. A organização dos horários iniciou com os da Engenharia de Alimentos e depois com os
 9 horários do Curso Técnico em Alimentos, que ficou organizado conforme documento em anexo. Serão
 10 ofertadas optativas, sendo uma delas de oferta especial. 2) Sobre o afastamento da Professora Luiza, ficou
 11 acordado em reunião que os professores Marília, Priscilla e Toni irão assumir os encargos didáticos
 12 referentes às disciplinas pertencentes a professora Luiza durante o período de seu afastamento para
 13 realização de pós-doutorado. Durante o primeiro semestre de 2019, a professora Priscilla assumirá a
 14 disciplina de Princípios de Conservação de Alimentos II da Engenharia de Alimentos e o professor Toni
 15 assumirá a disciplina de Conservação de Alimentos do Curso Técnico em Alimentos. Para o segundo
 16 semestre de 2019, a professora Priscilla assumirá as disciplinas Princípios de Conservação de Alimentos
 17 I e Matérias-Primas Alimentícias, professora Marília assumirá a disciplina de Embalagens para Alimentos,
 18 sendo estas disciplinas do curso de Engenharia de Alimentos. Já o professor Toni assumirá a disciplina de
 19 Conservação de Alimentos do Curso Técnico em Alimentos. Nada mais havendo a tratar, encerrou-se a
 20 reunião às quinze horas e trinta minutos e eu, Priscilla Pereira dos Santos, lavrei a presente ata, que vai
 21 por todos assinada, contendo este termo vinte e uma linhas.

Aline Maria Cenci Aline Cenci
 Andressa Sausen de Freitas Andressa Sausen de Freitas
 Cristiane Reinaldo Lisboa Cristiane Reinaldo Lisboa
 Guilherme Barcellos de Moura Guilherme B. de Moura
 Leonardo Souza da Rosa Leonardo Souza da Rosa
 Luiza Pieta Luiza Pieta
 Marlice Salete Bonacina Marlice S. Bonacina
 Marília Assunta Sfredo Marília A. Sfredo
 Priscilla Pereira dos Santos Priscilla Pereira dos Santos
 Toni Luis Benazzi Toni Luis Benazzi
 Valeria Borszcz Valeria Borszcz
 Wagner Luiz Priamo Wagner Luiz Priamo