

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MUTAGÊNESE MARCADA COM
ASSINATURA PARA A OBTENÇÃO DE MUTANTES DE *Escherichia coli*
PATOGENICA AVIÁRIA COM VIRULÊNCIA ATENUADA

Dissertação de Mestrado

Daniel Brisotto Pavanelo

Porto Alegre, março de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MUTAGÊNESE MARCADA COM
ASSINATURA PARA A OBTENÇÃO DE MUTANTES DE *Escherichia coli*
PATOGENICA AVIÁRIA COM VIRULÊNCIA ATENUADA

Daniel Brisotto Pavanelo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Prof. Dra. Fabiana Horn

Porto Alegre, março de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Celular, situado no Departamento de Biofísica da UFRGS, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Este trabalho é dedicado àqueles que fazem Ciência e contribuem ao desenvolvimento do nosso país.

AGRADECIMENTOS

A todos que me ajudaram a concluir este trabalho, e aos que vão me ajudar a dar continuidade a ele no doutorado;

Àqueles que me deram suporte nas fases difíceis;

Aos que estavam ao meu lado durante a minha trajetória;

Aos que me ensinaram, pois esse foi o momento de maior aprendizado para a minha carreira de pesquisador;

Aos que me deram oportunidade;

Aos que me incentivaram a continuar;

Aos que me fizeram feliz.

Muito obrigado!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Produção avícola no Brasil	15
1.2. <i>E. coli</i> patogênicas.....	16
1.3. <i>E. coli</i> patogênicas aviárias	17
1.4. Fatores de virulência de APEC	19
1.4.1. Adesinas.....	19
1.4.1.1. Adesinas fimbriais.....	20
1.4.1.2. Adesinas afimbriais.....	21
1.4.2. Invasinas	21
1.4.3. Fatores de resistência ao soro	23
1.4.4. Fatores de aquisição de ferro.....	24
1.4.5. Toxinas.....	26
1.4.6. Outros fatores de virulência.....	27
1.5. A cepa MT78	27
1.6. A técnica de STM.....	29
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. Cepas, plasmídeos, condições de crescimento e conservação	36
3.2. Preparação de células competentes.....	36
3.3. Eletroporação	37
3.4. Extração de plasmídeos	37
3.5. Conjugação.....	38

3.6. Teste de sensibilidade à ampicilina	39
3.7. Organização da biblioteca de mutantes.....	39
3.8. Cultura de fibroblastos	39
3.9. Ensaio de invasão	40
3.10. Extração de DNA	41
3.11. Amplificação das <i>tags</i> dos <i>pools</i>	42
3.12. Síntese das <i>tags</i> marcadas	42
3.13. Isolamento das <i>tags</i>	42
3.14. Preparação das membranas para hibridização DNA-DNA	43
3.15. Hibridização DNA-DNA.....	44
3.16. Detecção das <i>tags</i> nas membranas.....	44
3.17. Determinação da concentração de DNA.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. Produção da biblioteca de mutantes.....	46
4.2. Ensaio de seleção dos mutantes	47
4.3. Padronização das técnicas de biologia molecular	47
4.4. Identificação dos mutantes com virulência atenuada	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	66
REFERÊNCIAS.....	68
CURRICULUM VITAE	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do plasmídeo pUTmini-Tn5km2 com os genes e sequências relevantes neste estudo.	33
Figura 2. Esquema das cepas após receberem o plasmídeo.....	34
Figura 3. Gel mostrando a amplificação das <i>tags</i> dos <i>pools</i> de infecção e recuperação 7, 17 e 18.	50
Figura 4. Gel com as <i>tags</i> marcadas com digoxigenina dos <i>pools</i> de infecção e recuperação 7, 8 e 9.	51
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose GTG NuSieve 4% das <i>tags</i> digeridas pela enzima de restrição HindIII.	53
Figura 6. Hibridização DNA-DNA do <i>pool</i> 11.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número total de mutantes recuperados e número de mutantes recuperados para cada célula eucariótica, nos ensaios de invasão.....	48
Tabela 2. Concentração e pureza das amostras de DNA extraídas de cada <i>pool</i> de mutantes.....	49
Tabela 3. Resultado da hibridização do <i>pool 3</i>	56
Tabela 4. Resultado da hibridização do <i>pool 4</i>	57
Tabela 5. Resultado da hibridização do <i>pool 6</i>	58
Tabela 6. Resultado da hibridização do <i>pool 7</i>	59
Tabela 7. Resultado da hibridização do <i>pool 8</i>	60
Tabela 8. Resultado da hibridização do <i>pool 9</i>	61
Tabela 9. Resultado da hibridização do <i>pool 11</i>	62
Tabela 10. Resultado da hibridização do <i>pool 15</i>	63
Tabela 11. Resultado da hibridização do <i>pool 18</i>	64
Tabela 12. Resultado da hibridização do <i>pool 20</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

afa	adesina afimbriada
AIEC	<i>Escherichia coli</i> aderente e invasiva
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
astA	citotoxina estável ao aquecimento
CEC-32	linhagem celular de fibroblastos aviários
chuA	gene receptor de heme
cnf 1/2	fator citotóxico necrotizante
ColV	plasmídeo de Colicina V
crl	curli (<i>Curli fiber gene</i>)
csg	(ver crl)
CTAB	cetil-trimetil-brometo de amônio
cvi/cva	gene que codifica a Colicina V
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleosídeos trifosfatados
dra	adesina Dr (<i>Dr antigen-specific adhesin</i>)
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
entABCDEF	genes da enterobactina
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênicas extra-intestinais
fim	fímbria do tipo 1
foc	fímbria do tipo 1C
fyuA	receptor da captação de ferro
gimB	ilha de patogenicidade associada a NMEC
hlyA	hemolisina A
hra	adesina de aglutinação resistente à temperatura

ibeA	invasina do endotélio cerebral
InPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênicas intestinais
ireA	elemento responsável ao ferro
iroBCDEN	genes da Salmoquelina
irp2	proteína repressível por ferro
iss	proteína de aumento da resistência ao soro
<i>iuc/iut</i>	genes da aerobactina
kb	mil pares de bases
kpsMTII	cápsula II (<i>Group II capsule antigens</i>)
LB	Luria Bertani
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
m/v	massa por volume
malX	ilha de patogenicidade (Pathogenicity-associated island marker)
mat	fímbria associada à meningite
MntH	<i>bacterial homolog of mammalian natural resistance associated macrophage protein 1</i>
NCBI	Centro Nacional para Informações Biotecnológicas
neuC	cápsula K1 (<i>K1 capsular polysaccharide</i>)
NMEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de meningite neonatal
ompA	proteína de membrana externa (<i>Outer membrane protein</i>)
pap	pilus associado à pielonefrite
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato-salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
pic	autotransportador serina-protease
PM	padrão de peso molecular
rev/min	revoluções por minuto
rpm	rotações por minuto
sat	toxina secretada (<i>secreted autotransporter toxin</i>)
SDS	dodecil sulfato de sódio
sfa	fímbria do tipo S

<i>sitABCD</i>	sistema de transporte de ferro
SSC	tampão cloreto de sódio – citrato de sódio
STM	mutagênese marcada por assinatura
TE	tris-EDTA
tia	invasina toxigênica
traT	proteína de transferência (<i>Transfer Protein</i>)
tsh	hemaglutinina sensível à temperatura
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC	unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
v/v	volume por volume
vat	toxina vacuolizante (<i>vacuolating autotransporter toxin</i>)
VERO	linhagem celular derivada do rim do macaco verde

RESUMO

Escherichia coli patogênica aviária (APEC) é o agente etiológico da colibacilose, doença que acomete galinhas, patos, perus e outras aves, principalmente entre a 2^a e a 12^a semana de vida. Existem diversos estudos sobre genes associados à virulência de APEC, mas eles ainda não são capazes de explicar todos os fenótipos de APEC. Portanto, outros genes associados à virulência – ainda não descritos – devem estar presentes em APEC. Para descobrir novos genes associados à virulência em APEC, uma cepa invasiva foi usada para a construção de uma biblioteca de 1.800 mutantes, através da técnica de mutagênese marcada com assinatura, que insere transposons aleatoriamente no genoma da bactéria. Os mutantes foram selecionados em um ensaio de invasão *in vitro* a fibroblastos aviários da linhagem CEC-32. A sequência dos transposons inseridos nos mutantes permite a identificação daqueles mutantes que não foram capazes de invadir os fibroblastos. Até agora, 11 de 20 *pools* de 90 mutantes cada foram analisados, e 48 mutantes parecem ter perdido a capacidade invasiva, ou seja, tiveram sua virulência atenuada. Os demais *pools* já foram selecionados e terão seu DNA analisado. Todos mutantes que possivelmente perderam sua capacidade invasiva serão testados novamente para confirmar seu fenótipo de virulência atenuada. Depois, a região contendo a sequência do transposon será sequenciada para que se descubra qual gene foi interrompido e é essencial para a virulência *in vitro* de APEC. Essa biblioteca de mutantes também pode ser testada em modelos de seleção *in vivo*, de modo que é possível identificar, através da análise dos mutantes ausentes na seleção, genes de virulência essenciais para APEC em diferentes condições.

Palavras-chave: *Escherichia coli* patogênica aviária, mutagênese marcada com assinatura, genes de virulência.

ABSTRACT

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) is the causative agent of colibacillosis, a disease that affects poultry and other birds, mainly between two and twelve weeks of age. There are many studies about virulence-associated genes in APEC, but they do not fully explain all the APEC phenotypes. Therefore, other virulence-associated genes – not yet described – must be present in APEC strains. In order to find out new virulence genes, we made 1,800 random-transposons mutants of an APEC invasive strain using the signature-tagged mutagenesis method. The mutants were selected using an *in vitro* invasion assay to fibroblast cells. The sequence of the inserted transposons allows us to identify mutants that have lost the capacity of invade the cells. Until now, we tested eleven out of twenty pools of ninety mutants each, and forty-eight mutants appeared to have lost the invasive capacity. The other nine pools will be analyzed, and all the possible non-invasive mutants will be tested again to confirm the phenotype. Then, they will have the transposon-inserted region sequenced in order to find out which gene has been disrupted and is essential to APEC *in vitro* invasiveness. The attenuated mutants can also be selected *in vivo*, so we would identify essential virulence genes to APEC under different conditions.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli*; signature-tagged mutagenesis; virulence genes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção avícola no Brasil

A produção de carne de frango no Brasil foi de 13 milhões de toneladas em 2011, número que confere ao Brasil o terceiro lugar no mundo em produção de carne de frango, atrás apenas da China (13,2 milhões de toneladas) e dos Estados Unidos da América (16,8 milhões de toneladas). Quase 70% dessa produção foi destinada ao consumo pelo mercado interno, atingindo uma média de 47,4 kg de carne de frango por pessoa, um valor recorde. Os estados da região Sul do Brasil são os principais responsáveis por essa produção, contribuindo com 61,53% da produção nacional (UBABEF 2012).

As exportações de carne de frango atingiram 4,8 milhões de toneladas em 2011, número que mantém o Brasil como maior exportador mundial de carne de frango. O principal destino da carne exportada pelo Brasil são os países do Oriente Médio e da Ásia. O valor total da receita cambial, se somadas todas as formas de exportação (cortes, frango inteiro, frango industrializado e outras formas), foi de US\$ 7,9 bilhões de dólares (UBABEF 2012).

O fato de a produção avícola no Brasil ser a de mais baixo custo do mundo (Alves, et al. 2006), e de os animais terem atingido um alto padrão de evolução genética faz com que as melhorias na cadeia produtiva estejam voltadas à saúde e à nutrição das aves, já que a seleção de aves com alta taxa de crescimento a partir de uma menor quantidade de alimentos têm tornado os animais mais suscetíveis a infecções por microrganismos (Swaggerty, et al. 2009), como o vírus Influenza, espécies de Salmonela e *Escherichia coli*.

De acordo com a Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998, “Qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas.” (Brasil 1998). Baseado nas estimativas feitas por Fallavena e colaboradores (Fallavena, et al. 2000) e na produção brasileira de frango em 2011 (UBABEF 2012), a condenação de carcaças infectadas com *E. coli* teria sido de aproximadamente 27 mil toneladas de carne, o que corresponderia a quase US\$ 12 milhões (Alves, et al. 2006). Nesse sentido, este trabalho é focado na *E. coli* patogênica aviária, um dos principais agentes causadores de doenças infecciosas em aves.

1.2. *E. coli* patogênicas

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Foi descrita pela primeira vez em 1855, por Theodor von Escherich, possui formato de bacilo, é um organismo anaeróbico facultativo não-esporulado e é comensal do homem e de outros animais.

A maioria das cepas de *E. coli* não é patogênica, mas há um versátil subgrupo causador de infecções responsável por mortalidade e alto custo para os sistemas de saúde (Kaper, et al. 2004; Klemm, et al. 2010). Essas linhagens são altamente adaptadas e adquiriram atributos de virulência específicos que lhes conferiram habilidade de se adaptar a novos nichos e colonizar novos hospedeiros (Kaper, et al. 2004). Tais atributos podem ser encontrados em elementos genéticos, podendo estar presentes em diferentes combinações, como plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade e bacteriófagos (Kaper, et al.

2004). Para que um patógeno cause doença em um indivíduo saudável, é necessário que [1] se adapte e colonize o hospedeiro; [2] sobreviva no seu interior e se multiplique; [3] evada do seu sistema imunológico e [4] se dissemine a outros hospedeiros (Falkow 1991). Isso é possível graças aos fatores associados à virulência, que permitem à bactéria cumprir todas as etapas da infecção.

É possível dividir as *E. coli* patogênicas em dois grandes grupos, as patogênicas intestinais (InPEC, de Intestinal Pathogenic *E. coli*) e as patogênicas extraintestinais (ExPEC, de Extraintestinal Pathogenic *E. coli*). As InPEC são responsáveis pelas diarreias e podem apresentar diversas estratégias para invadir as células intestinais (Klemm, et al. 2010; Reis and Horn 2010). Como exemplos de InPEC, estão os subgrupos EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), DAEC (*E. coli* difusamente aderente) e AIEC (*E. coli* aderente e invasiva). As ExPEC, por sua vez, são classificadas em três subgrupos: as causadoras de infecção do trato urinário (UPEC, de UroPathogenic *E. coli*); as causadoras de meningite no neonato (NMEC, de Newborn Meningitis-associated *E. coli*); e as que causam colibacilose em aves (APEC, de Avian Pathogenic *E. coli*) (Kaper, et al. 2004). Apesar de colonizarem diferentes nichos e apresentarem estratégias de patogenicidade distintas, as *E. coli* patogênicas podem compartilhar genes de virulência.

1.3. *E. coli* patogênicas aviárias

A infecção de aves por *E. coli* foi descrita em 1894, por Lignieres. A bactéria *E. coli* foi isolada dos sacos aéreos de aves com doença respiratória em

1954 e 1955, por Wassermann *et al.* e Fahey, respectivamente (La Ragione and Woodward 2002). Tratava-se da colibacilose, a infecção bacteriana mais comum em aves, que se manifesta de várias formas, como peritonite do ovo, onfalite, síndrome da cabeça inchada, celulite e colissepticemia, sendo a última a mais grave forma de manifestação (La Ragione and Woodward 2002). A colissepticemia afeta galinhas, perus e patos de 2 a 12 semanas, e é caracterizada por pericardite, peri-hepatite, aerossaculite, sinovite, peritonite, conjuntivite e enterite (ALLAN, et al. 1993; CHEVILLE and ARP 1978; La Ragione and Woodward 2002). Aves selvagens, domésticas e ornamentais podem ser afetadas, normalmente após uma infecção bacteriana (por *Mycoplasma sp.*) ou viral (pelo Virus da doença de Newcastle ou da bronquite infecciosa, por exemplo) (Barnes, et al. 2003; La Ragione and Woodward 2002). Devido aos prejuízos significativos à avicultura mundial causados pela colibacilose (Dziva and Stevens 2008), vários grupos de pesquisa vêm investigando as bases moleculares da colibacilose aviária, bem como a interação patógeno-hospedeiro entre as aves e as cepas APEC e os perfis patogênicos, fenotípicos e genotípicos dessas bactérias.

As cepas de *E. coli* podem ser classificadas de diversas formas, sendo uma delas a determinação do sorogrupo. Para isso, é utilizada a identificação de antígenos somáticos (O, *Öhne*, LPS), capsulares (K, *Kapsel*), flagelares (H, *Hauch*) e fimbriais (F, *Fimbriae*), todos eles presentes na superfície bacteriana. Algumas cepas não podem ser sorotipadas, devido à perda parcial ou total da cadeia lipopolissacarídica (Ferreira and Knöbl 2000). Entre as APEC, os sorotipos mais comuns no hemisfério Norte são O1, O2, O8, O35 e O78 (La Ragione and

Woodward 2002). No Brasil, os sorotipos mais freqüentes são O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 (Ferreira and Knöbl 2000). Entretanto, em um trabalho recente, outros sorotipos considerados incomuns em APEC, como O6, O25, O46, O106, O111 e O143, mostraram-se mais prevalentes que os comuns. Esses sorotipos estão mais associados a ExPEC humanas, o que pode indicar uma capacidade das cepas humanas de colonizar aves (Knobl, et al. 2012).

Embora existam sorotipos mais associados às cepas APEC virulentas, não existe, até o momento, nenhum marcador do patotipo de APEC (Dziva and Stevens 2008). Sabe-se, no entanto, que ao menos uma adesina – para que a bactéria consiga se aderir aos sítios extra-intestinais do hospedeiro –, um fator de resistência ao soro – para que a bactéria consiga evadir do sistema complemento do hospedeiro – e um sistema de aquisição de ferro – para que a bactéria consiga sobreviver às baixas concentrações de ferro disponíveis nos líquidos biológicos do hospedeiro – são essenciais para que a bactéria apresente a capacidade de causar doença (Horn, et al. 2012). Além de genes pertencentes a essas três classes essenciais, as APEC apresentam genes distribuídos em outras classes, como toxinas e invasinas. Os genes associados à virulência mais importantes para APEC serão descritos a seguir.

1.4. Fatores de virulência de APEC

1.4.1. Adesinas

Conforme descrito por Gross (Gross 1961), o pulmão e os sacos aéreos são as principais portas de entrada de patógenos em aves, e o trato

gastrointestinal é um reservatório de cepas patogênicas e não-patogênicas de *E. coli*, devido ao comensalismo dessa bactéria com aves (Ewers, et al. 2009). A expressão de adesinas é uma forma de facilitar a passagem da bactéria do intestino para a corrente sanguínea, bem como a colonização dos pulmões da ave (Stordeur, et al. 2002).

1.4.1.1. Adesinas fimbriais

As adesinas mais estudadas e mais bem caracterizadas são as adesinas fimbriais. As fímbrias são filamentos ou apêndices de proteínas expressos na superfície celular das bactérias, de 1 µm de comprimento e 7 nm de largura, formadas por cerca de 1000 subunidades proteicas (Klemm, et al. 2010), e podem ser de diferentes tipos (Dziva and Stevens 2008). A fímbria mais comum em APEC é a fímbria do tipo 1 (*fim*), cuja maior subunidade é a proteína FimA; é codificada por um operon de 9 genes (Klemm, et al. 2010), e está presente em mais de 70% das cepas APEC (Antao, et al. 2009b; Barbieri, et al. 2013; Dho-Moulin and Fairbrother 1999; Ewers, et al. 2007). Na sua extremidade mais externa, encontra-se a proteína FimH, responsável pelo reconhecimento de moléculas de manose, que promove a aderência da bactéria às superfícies mucosas (Arné, et al. 2000). Outra fímbria importante para ExPEC é a fímbria P, codificada pelo operon *pap*. Em humanos, a fímbria P está associada à pielonefrite (Sauer, et al. 2000); em aves, à colonização dos órgãos internos depois do estabelecimento da infecção inicial (La Ragione and Woodward 2002; Pourbakhsh, et al. 1997b). Entretanto, a presença de fímbria P em APEC é cerca de 30% (Barbieri, et al. 2013), mas apenas 10% das APEC expressam seu

operon (Charles Dozois, comunicação pessoal). A fímbria F1C é uma estrutura semelhante à fímbria do tipo 1; é codificada pelo operon *foc*, e sua maior subunidade é a proteína FocA (Klemm, et al. 2010). A fímbria S é outra estrutura encontrada em APEC, embora esteja mais associada a NMEC (Antao, et al. 2009b). É codificada pelo operon *sfa*, e pode ser associada à fímbria F1C no operon *sfa/foc*. Outra fímbria, presente em todas as APEC, é Curli (Barbieri, et al. 2013; Ewers, et al. 2007), uma estrutura fina e enrolada. É codificada pelo operon *csg*, e sua maior subunidade é a proteína CsgA (Klemm, et al. 2010).

1.4.1.2. Adesinas afimbriais

A adesina afimbriada Tsh (temperature-sensitive haemagglutinin), da família dos autotransportadores secretados por bactérias Gram-negativas (Stathopoulos, et al. 1999), é importante para APEC por contribuir para as primeiras etapas da infecção, incluindo a colonização dos sacos aéreos (Dozois, et al. 2000). Além disso, Tsh é responsável pela aglutinação de hemácias em temperaturas inferiores a 26° C (Provence and Curtiss 1994). Outra adesina afimbriada é *afa*, codificada pelo cluster gênico *afa-8*, uma das adesinas afimbriais mais frequentes em *E. coli* patogênicas humanas, e está associada a cepas APEC *pap*-negativas (Dziva and Stevens 2008; Stordeur, et al. 2002). Essa adesina contribui para a virulência a pintos de 1 dia, e para a indução de colibacilose clássica da mesma maneira que as cepas *pap*-positivas (Stordeur, et al. 2004).

1.4.2. Invasinas

A invasão às células do hospedeiro permite que a bactéria se multiplique ou permaneça em estado quiescente no interior das células (Falkow 1991). Até o momento, não foi elucidado o processo pelo qual APEC chega à circulação sanguínea (Dziva and Stevens 2008), mas experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram que cepas APEC são capazes de sobreviver à ação de macrófagos (Mellata, et al. 2003b; Pourbakhsh, et al. 1997a) e experimentos *in vitro* demonstram que pelo menos uma cepa APEC é capaz de invadir fibroblastos aviários (Matter, et al. 2011).

Entre os fatores de virulência envolvidos no processo de invasão por APEC a células de seu hospedeiro estão a proteína IbeA e o homólogo da proteína Tia, bem como os genes presentes na ilha de patogenicidade *gimB*. A proteína IbeA foi descrita em NMEC, e sua função é auxiliar na invasão da barreira hematoencefálica (Kim 2001). Em APEC a frequência desse gene é cerca de 20% (Barbieri, et al. 2013; Ewers, et al. 2007), e sua provável função é auxiliar na colonização do epitélio pulmonar (Cortes, et al. 2008; Germon, et al. 2005; Moulin-Schouler, et al. 2006). A expressão do gene *ibeA* também está relacionada a um aumento da expressão da fímbria do tipo I e, conseqüentemente, à formação de biofilmes (Wang, et al. 2011).

A proteína Tia foi descrita na *E. coli* enterotoxigênica, desempenhando o papel de aderência e invasão de células humanas íleo-cecais e epiteliais colônicas em cultura (Fleckenstein, et al. 1996). Em APEC, a proteína homóloga à Tia é codificada pelo gene *tia*, localizado em uma ilha de patogenicidade de 56 kb, a mesma que codifica o operon *pap* e outros fatores de virulência (Kariyawasam, et al. 2006).

A ilha de patogenicidade *gimB*, que é característica de NMEC, está associada à manutenção dos níveis de bacteremia característicos da meningite (Bonacorsi, et al. 2003). A frequência do gene *gimB* em APEC é cerca de 10% (Barbieri, et al. 2013; Ewers, et al. 2007). Apesar de *ibeA* e *gimB* aparecerem em baixas frequências em isolados de APEC, sua presença está correlacionada a índices mais altos de patogenicidade em pintos de 1 dia (Barbieri, et al. 2013).

1.4.3. Fatores de resistência ao soro

APEC têm sua virulência aumentada devido a fatores que oferecem resistência à ação do sistema complemento e à fagocitose mediada por opsonização (Nolan, et al. 2003). O plasmídeo colV é importante para a resistência ao soro, pois codifica o gene da colicina V - uma proteína importante na infecção de pintos de 1 dia (Zhao, et al. 2009) -, *traT* e *iss*, que supostamente protegem a membrana bacteriana do ataque do sistema complemento (Dziva and Stevens 2008). Acredita-se que a proteína TraT antagoniza a deposição de C3 (Agüero, et al. 1984) e inibe a formação do complexo C5b6 (Pramoonjago, et al. 1992). A proteína Iss desempenha um papel importante na resistência de APEC ao soro (Mellata, et al. 2003a), e sua presença é necessária para a virulência como um todo (Tivendale, et al. 2004). Entretanto, em estudo de transcriptoma realizado com a cepa APEC O1, comparando os genes expressos em caldo LB e em soro de galinha, o gene *iss* não mostrou expressão diferenciada entre as duas condições (Li, et al. 2011).

Outro fator de virulência bastante prevalente em cepas ExPEC que também é encontrado em APEC é a cápsula K1 (La Ragione and Woodward

2002). A cápsula K1 é um polissacarídeo que contém ácido polissialílico e está associado a infecções extra-intestinais (Bliss, et al. 1996). Além disso, esse fator de virulência possui propriedade anti-fagocítica (Van Dijk, et al. 1979), pode estar envolvido na resistência ao soro (Stawski, et al. 1990) e é essencial para a penetração da barreira hemato-encefálica (Kim 2008). Tão importante é a importância da cápsula K1 que a sua presença é necessária para classificar uma cepa *E. coli* como NMEC (Kim 2003). Os genes envolvidos na síntese e na exportação da cápsula K1 são *neuC* e *kpsMTII* (Arrecubieta, et al. 2001; BREE, et al. 1989). Um recente estudo realizado pelo nosso grupo correlaciona a presença do gene *kpsMTII* a índices mais altos de patogenicidade em pintos de 1 dia (Barbieri, et al. 2013).

A proteína OmpA, presente na maioria das cepas APEC (Barbieri, et al. 2013), faz parte da membrana externa de *E. coli* e outras enterobactérias. Desempenha função de adesina, invasina e serve, ao mesmo tempo, como alvo do sistema imunológico do hospedeiro e como fator de resistência ao soro. OmpA também é sítio de reconhecimento por vários bacteriófagos (Smith, et al. 2007).

1.4.4. Fatores de aquisição de ferro

A habilidade de sequestrar ferro dos tecidos corporais desempenhada pelas bactérias patogênicas é essencial para sua virulência, pois o ferro é utilizado na cadeia respiratória e está em baixas concentrações nos tecidos do hospedeiro. Em APEC, essa característica está associada à letalidade de pintos de 1 dia (de Brito, et al. 2003; Dho and Lafont 1984). Entre os sistemas sideróforos, o sistema da aerobactina é o mais bem caracterizado e foi descrito

em uma ilha de patogenicidade de *Shigella* (Vokes, et al. 1999). Um trabalho recente mostrou que o sistema da aerobactina é codificado também em uma região conservada de virulência de um plasmídeo do tipo ColV, pAPEC-O2-ColV (Johnson, et al. 2006). O sistema da aerobactina é composto pelo operon *iucABCD* e pelo gene *iut*, que codificam um sideróforo hidroxamato e o receptor férrico da aerobactina (Dziva and Stevens 2008; La Ragione and Woodward 2002). A transformação de uma *E. coli* comensal com o plasmídeo contendo o sistema da aerobactina aumentou a letalidade da cepa para embriões aviários e a capacidade de colonização renal em camundongos (Skyberg, et al. 2006), demonstrando a importância desse sistema à virulência. Outro fator de aquisição de ferro, também encontrado em plasmídeos do tipo ColV, é a salmoquelina, codificada pelo operon *iroBCDEN* e necessária para a virulência *in vivo* de APEC (Caza, et al. 2008). Da mesma família da salmoquelina (sideróforos catecolatos), a enterobactina é outro sistema de aquisição de ferro, codificado pelo operon *entABCDEF* e cuja secreção pode ser essencial para a virulência de APEC, caso não haja nenhum outro sideróforo expresso pela cepa (Caza, et al. 2011). Uma das proteínas desse sistema, IroN, tem a sua expressão regulada de acordo com a presença de ferro no meio (Sorsa, et al. 2003).

Outro sideróforo é o sistema transportador de ferro codificado pelo operon *sitABCD*. O sistema é composto por permeases, que aumentam a captura de ferro e manganês, contribuindo com a multiplicação bacteriana. Juntamente com a proteína MntH, o sistema medeia a resistência ao estresse oxidativo (Sabri, et al. 2008). Outros fatores sideróforos, como *fyuA* e *irp2*, foram primeiramente descritos em *Yersinia enterocolitica*, mas também são encontrados em InPEC e

APEC (La Ragione and Woodward 2002). O gene *ireA*, outro fator associado à captação de ferro, foi descrito em cepa UPEC e contribui para aumentar a invasão em bexiga de camundongos (Russo, et al. 2001). O gene *chuA*, receptor e utilizador de ferro heme em *E. coli*, foi descrito em APEC através de experimento por STM *in vivo* (Li, et al. 2005), sugerindo seu papel na virulência.

O fato de as APEC apresentarem sistemas de aquisição de ferro com funções redundantes em seu genoma reforça a importância desses sistemas para a virulência dessas bactérias. É necessário que ao menos um sistema sideróforo esteja funcional para que a bactéria consiga sobreviver às baixas concentrações de ferro disponível nos líquidos biológicos do hospedeiro.

1.4.5. Toxinas

Bactérias patogênicas são capazes de produzir substâncias que, *per se*, são tóxicas ao hospedeiro. Entre as toxinas mais frequentes em APEC está a proteína Vat (Barbieri, et al. 2013; Ewers, et al. 2007), codificada pelo gene *vat* em uma ilha de patogenicidade. Essa toxina gera vacúolos na célula do hospedeiro, levando a um efeito citotóxico semelhante ao observado pela toxina *VacA*, de *Helicobacter pylori* (Parreira and Gyles 2003). Há também toxinas com baixa frequência em APEC (em torno de 1%) (Barbieri, et al. 2013; Ewers, et al. 2007), como a α -hemolisina, codificada pelo gene *hlyA*, que causa hemólise no hospedeiro. Hemolisinas são produzidas por diversas bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Em APEC, a α -hemolisina é secretada por um sistema de secreção do tipo I (Finlay and Falkow 1997; Nagai, et al. 1998). O fator de citotoxicidade necrosante, codificado pelo gene

Cnf1/2 (De Ricke, et al. 1999), e a serino-protease codificada pelo gene *sat* (Guyer, et al. 2000), também são pouco frequentes em APEC. Ensaio com cepas que apresentam esses genes mostraram citotoxicidade para células VERO.

1.4.6. Outros fatores de virulência

Além dos fatores anteriormente descritos, existem diversos outros, alguns ainda sem classificação, como o gene *pic*, que possui atividade serino-proteásica (Heimer, et al. 2004) – entretanto, sua presença está associada a uma diminuição na virulência a pintos de um dia (Barbieri, et al. 2013) –, e a ilha de patogenicidade *malX* que, além de ser um marcador de virulência, contribui com a patogenicidade de APEC (Johnson and Russo 2005).

Foram descritas, em APEC, proteínas inibidoras de lisozima, enzima importante na primeira linha de defesa de mamíferos e aves contra bactérias. Essas proteínas inibidoras de lisozima, *ivy*, *pliG* e *mliC*, possuem especificidade quanto ao tipo de lisozima presente no hospedeiro. A ausência de *mliC* reduziu drasticamente a virulência de APEC em soro de galinha e *in vivo* (Vanderkelen, et al. 2012).

Recentemente, o gene *luxS* foi considerado importante na regulação da virulência de APEC através do mecanismo de *quorum sensing*. Sua ausência diminuiu a virulência de cepa APEC *in vivo* (Han, et al. 2013).

1.5. A cepa APEC MT78

Entre as diversas cepas APEC estudadas, uma de alta virulência e bem caracterizada é a cepa MT78, isolada na França, em 1982 (Dho and Lafont 1982),

da traqueia de uma galinha com colibacilose associada à infecção por *Mycoplasma sp.* Essa cepa vem sendo estudada pelo nosso grupo e mostrou-se capaz de causar morte celular por apoptose em macrófagos aviários (Horn, et al. 2007). Em ensaios *in vivo*, a cepa MT78 foi capaz de matar 7 de 18 frangos de 3 semanas inoculados; nos demais, causou infecção sistêmica e lesão nos órgãos internos. Também foi detectada a presença da bactéria no cérebro de uma dessas aves (Barbieri et al., 2013, dados não publicados).

Em outro estudo do nosso grupo, no qual várias cepas virulentas foram testadas em ensaios de invasão de fibroblastos aviários de linhagem (CEC-32), a cepa MT78 foi a única que se mostrou invasiva, superando o controle positivo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344. Também nesse estudo as cepas foram genotipadas quanto a 33 genes associados à virulência. A cepa MT78 apresentou 20 deles, sendo ao menos um de cada uma das categorias anteriormente descritas (exceto toxinas) (Matter, et al. 2011). Foram eles: adesinas (*crl*, *fimC* e *hrlA/hek*); invasinas (*gimB* e *ibeA*); sistemas de aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iroN*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr* e *sitD ep*); fatores de resistência ao soro (*iss*, *neuC*, *kpsMTII*, *ompA* e *traT*) e outros (*cvi/cva* e *RpaI*).

Analisando-se o perfil de genes de virulência das cepas não-invasivas, não foi possível encontrar diferenças entre a cepa MT78 e a cepa IMT2470 que, além de possuir todos os fatores de virulência presentes na MT78, possui três genes codificadores de adesinas (*papC*, *tsh* e *mat*), um de invasina (*tia*) e dois de toxinas (*astA* e *vat*) adicionais (Matter, et al. 2011).

O fato de a MT78 ser a única cepa a apresentar comportamento invasivo, mesmo possuindo os mesmos genes de virulência de uma cepa não-invasiva,

indica a possibilidade de que há genes associados à virulência que ainda não foram descritos.

Outro dado que indica essa mesma possibilidade é o fato de uma cepa, pertencente a uma coleção brasileira de 200 isolados, apresentar o índice máximo de patogenicidade em pintos de 1 dia sem possuir qualquer sistema de aquisição de ferro descrito (Barbieri, et al. 2013). Existe a possibilidade de a cepa em questão possuir algum sistema de aquisição de ferro ainda não identificado em APEC, pois tais sistemas são essenciais para que a bactéria sobreviva às baixas concentrações de ferro nos líquidos biológicos do hospedeiro.

1.6. A técnica de Mutagênese Marcada com Assinatura (STM)

A disponibilidade de 3.988 genomas de bactérias sequenciados (NCBI 2013b) – sendo 57 sequências de *E. coli* (NCBI 2013a), apenas uma de APEC (Johnson, et al. 2007) – gerou tantos dados, que requer novas ferramentas e técnicas para analisá-los. É necessário saber o que e como procurar as informações desejadas. A grande dificuldade é a falta de função atribuída à maioria dos genes (Raskin, et al. 2006).

Uma das técnicas mais atrativas para estudos genômicos de microrganismos é a Mutagênese Marcada com Assinatura (STM, do inglês Signature-Tagged Mutagenesis) (Mazurkiewicz, et al. 2006).

A técnica de STM foi descrita em 1995, por Hensel *et al.* (Hensel, et al. 1995), quando 1152 mutantes de *S. typhimurium*, carregando sequências únicas de DNA (*tags*), foram divididos em 12 *pools* (conjuntos) e inoculados em camundongos. Quarenta desses mutantes não foram recuperados após a

inoculação nos camundongos. A região flanqueadora das *tags* inseridas em 28 desses 40 mutantes foi sequenciada. Foram encontrados genes já descritos para *S. enterica serovar Typhimurium*, genes descritos para *E. coli*, sequências similares a genes descritos para bactérias e sequências desconhecidas (Hensel, et al. 1995). Esse estudo foi muito importante por ter desenvolvido uma técnica que permitiu a identificação simultânea de genes de virulência utilizando poucos animais.

Foram desenvolvidos pelo menos dois trabalhos com essa técnica utilizando-se cepas APEC. Um deles permitiu a detecção dos genes *chuA* e *sitB* (sistemas de captação de ferro) na cepa APEC IMT5155 (Li, et al. 2005), e o outro detectou a adesina fimbrial Yqi (ExPEC Adesina I) nessa mesma cepa (Antao, et al. 2009a). Em cada um desses estudos foi confeccionada uma biblioteca de 1800 mutantes, divididos em *pools*, que foram inoculados em galinhas. Aqueles mutantes que não foram recuperados após a inoculação tiveram a sequência flanqueadora de sua *tag* sequenciada.

A técnica de STM consiste na construção de uma biblioteca de mutantes com uma assinatura molecular (*tag*), que é uma sequência de DNA inserida no genoma da bactéria através de algum vetor, que pode ser um plasmídeo carregando um transposon. O plasmídeo utilizado para transformar a cepa *E. coli* S17-1 *λpir* foi o vetor pUT associado a transposons do tipo mini-Tn5 $km2$, formando plasmídeos pUTmini-Tn5 $km2$. O vetor pUT contém, entre outros, o gene que confere resistência à ampicilina (De Lorenzo and Timmis 1994). O transposon mini-Tn5 $km2$ contém o gene que confere resistência à canamicina (De Lorenzo, et al. 1990), além de uma sequência de 80 pares de bases (pb), sendo

40 pb variáveis flanqueadas por 40 pb constantes. Os 40 pb variáveis compreendem a *tag*, ou seja, a sequência que vai diferenciar cada mutante de um mesmo *pool*; já os 40 pb constantes, divididos em 20 pb a montante e 20 pb a jusante, servem como molde para a amplificação da *tag* (Li, et al. 2005). O plasmídeo pUTmini-Tn5km2 é um sistema de entrega que permite a incorporação do transposon Tn5km2 no genoma da bactéria. Essa incorporação só ocorre, entretanto, na MT78, pois na cepa *E. coli* S17-1 λ pir o plasmídeo mantém-se viável no citoplasma da bactéria. Portanto, após a transformação da *E. coli* S17-1 λ pir, essa cepa torna-se resistente aos dois antibióticos cujos genes de resistência estão no plasmídeo (ampicilina e canamicina) (**Figura 1**), ao passo que a MT78, após a conjugação com a *E. coli* S17-1 λ pir transformada, torna-se resistente apenas ao antibiótico cujo gene de resistência está no transposon (canamicina) (**Figura 2**). Sendo assim, o teste de susceptibilidade à ampicilina é uma forma de detectar a incorporação do transposon ao genoma dessa cepa. É gerada, assim, uma mutagênese não direcionada, pois a *tag* pode inserir-se em qualquer parte do genoma. Os mutantes são divididos em *pools* para que se obtenha maior rendimento das *tags*, já que os *pools* são testados separadamente e, dessa forma, não há problema que haja *tags* iguais em *pools* diferentes. Os mutantes devem passar por alguma forma de seleção (nos estudos citados, infecção de camundongos e galinhas), após a qual são recuperados. O DNA dos mutantes é extraído e as *tags* são amplificadas por PCR. As *tags* são amplificadas mais uma vez com alguma molécula marcadora. Esse procedimento é realizado com o DNA do *pool* de bactérias que é inoculado e com o do *pool* que é recuperado após a infecção. O objetivo da técnica é detectar quais os mutantes

que estão presentes no *pool* de infecção e ausentes no *pool* de recuperação, e essa identificação é feita através da comparação das *tags* amplificadas. Para isso, é feita uma hibridização DNA-DNA (*dot blot*) com cada *pool* (infecção e recuperação) e os sinais da hibridização são comparados. Aquelas *tags* que emitiram sinal no *pool* de infecção, mas não emitiram no *pool* de recuperação, devem estar inseridas em algum gene importante para a virulência, pois o mutante não colonizou o hospedeiro no ensaio de seleção. As sequências que flanqueiam a *tag* são, então, determinadas por sequenciamento. São utilizados bancos de dados para comparar as sequências encontradas com as já existentes. Assim é possível descobrir a função do gene interrompido pela *tag*, se esse gene já foi descrito para outro organismo, se há alguma homologia do gene encontrado com algum outro já descrito, ou se esse gene é completamente novo.

A técnica de STM é promissora por permitir uma triagem (*screening*) aleatória e simultânea de todo o genoma de microrganismos, possibilitando a identificação de genes de virulência e podendo ser aplicada de várias maneiras, seja *in vivo* ou *in vitro*.

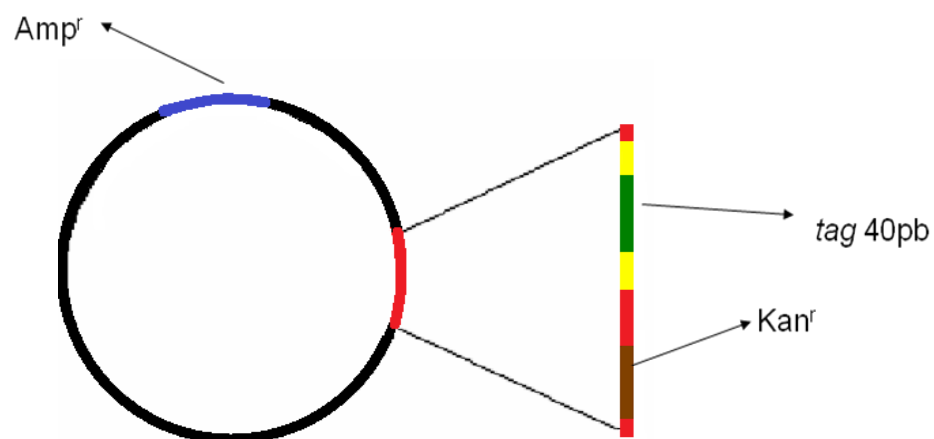


Figura 1. Esquema do plasmídeo pUTmini-Tn5km2 com os genes e sequências relevantes neste estudo. Em azul, gene de resistência à ampicilina. Em vermelho, o transposon Tn5km2. No transposon, em marrom, o gene de resistência à canamicina; em verde, a *tag* de 40 pares de bases; em amarelo, as sequências flanqueadoras conservadas para as 90 *tags*.

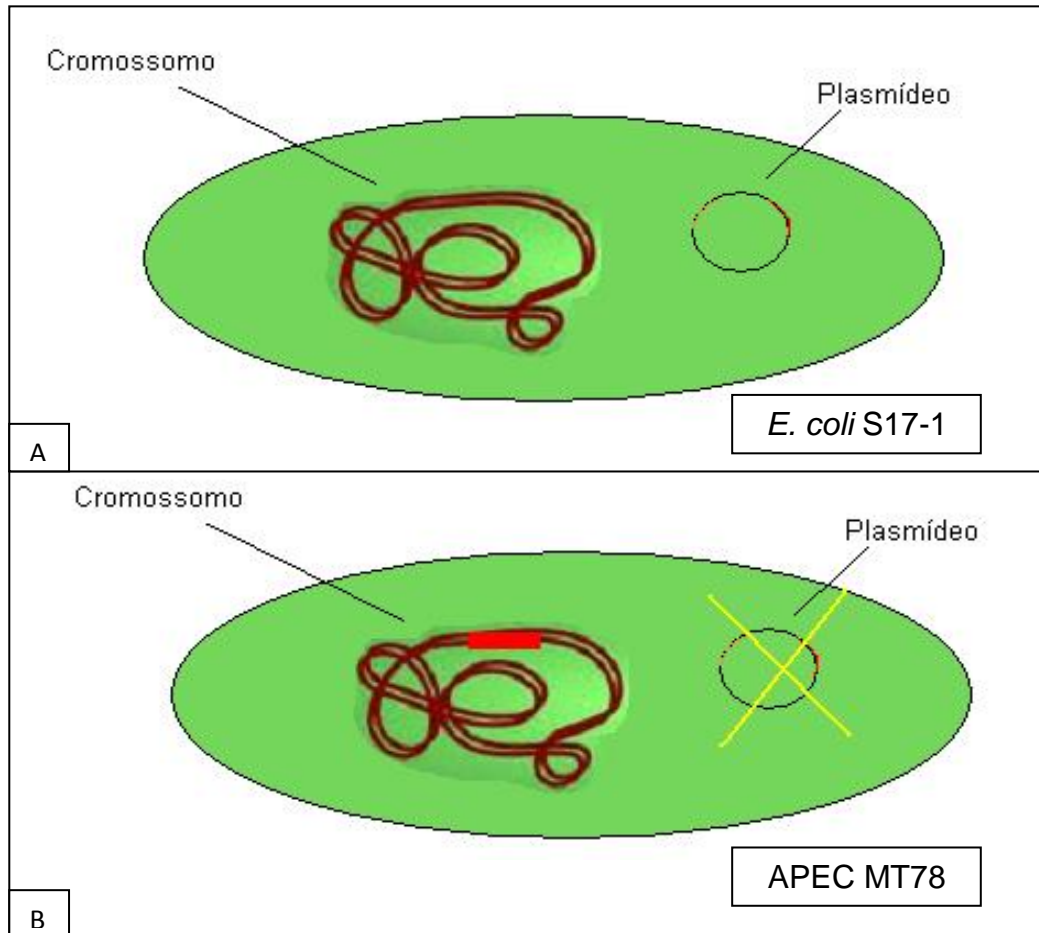


Figura 2. Esquema das cepas após receberem o plasmídeo. (A) Após a eletroporação, o plasmídeo mantém-se intacto no citoplasma da S17-1 λ pir, conferindo a essa cepa resistência à ampicilina e à canamicina. (B) Após a conjugação, o plasmídeo não se replica na MT78, de modo que apenas o transposon – contendo a *tag* e o gene de resistência à canamicina – é incorporado ao genoma (marca vermelha).

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo é a produção de uma biblioteca de mutantes da cepa MT78, a seleção desses por ensaios de invasão a células aviárias não-fagocitárias (fibroblastos de linhagem CEC-32) e a identificação dos mutantes com virulência atenuada.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Padronizar as técnicas de eletroporação e conjugação, para a produção da biblioteca de mutantes;

2.1.2. Realizar ensaios de invasão a células não-fagocitárias, seguindo o mesmo modelo do trabalho que classificou a cepa MT78 como uma cepa invasiva;

2.1.3. Padronizar as técnicas de extração de DNA, PCR com marcação com digoxigenina, clivagem com HindIII e isolamento das *tags*;

2.1.4. Padronizar as reações de hibridização DNA-DNA para identificar os mutantes que perderam a capacidade de invadir as células não-fagocitárias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas, plasmídeos, condições de crescimento e conservação

A cepa APEC MT78 (O2:K1) foi utilizada para a construção de uma biblioteca de mutantes e para os ensaios de invasão. Essa cepa é naturalmente resistente ao antibiótico ácido nalidíxico, e sensível aos antibióticos ampicilina e canamicina.

A cepa *E. coli* S17-1 λ pir foi utilizada como aceptora e doadora dos plasmídeos (Li, et al. 2005). Essa cepa, quando sem plasmídeos, é sensível aos três antibióticos anteriormente mencionados.

Nesse estudo foram utilizados 90 plasmídeos contendo transposons pUTmini-Tn5km2 (cedidos por Ganwu Li, Universidade de Iowa, EUA), cada um contendo uma *tag* diferente.

O crescimento das bactérias ocorreu em meio Luria-Bertani (LB), caldo ou ágar, ou ágar MacConkey, suplementados, quando necessário, com ampicilina (50 µg/mL), canamicina (50 µg/mL) e/ou ácido nalidíxico (30 µg/mL), sempre a 37 °C. Os estoques dos mutantes da cepa MT78 foram conservados em caldo LB com canamicina e ácido nalidíxico em 20% de glicerol a -80 °C. Os estoques de *E. coli* S17-1 λ pir transformada foram conservados em caldo LB com canamicina e ampicilina em 20% de glicerol a -80 °C.

3.2. Preparação de células competentes

A partir de pré-inóculo da cepa *E. coli* S17-1 λ pir multiplicada a 37 °C com agitação constante de 160 rev/min durante a noite, 1 mL foi inoculado em 100 mL

de caldo LB, e incubado a 37 °C sob agitação constante de 180 rev/min até a fase log de crescimento (0,74 de densidade óptica com $\lambda = 600$ nm). Atingida essa fase, o inóculo foi colocado no gelo por 30 minutos, e, após, centrifugado a 4.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi lavado duas vezes com 50 mL de glicerol 10% gelado. As células foram suspensas em caldo LB, aliqüotadas e armazenadas a -80 °C.

3.3. Eletroporação

Para cada eletroporação, foram usados 50 μ L de células competentes e 5 μ L de plasmídeo (100 ng/mL). O pulso foi de 2,5 V, seguido de incubação por 1 minuto em meio LB a 37° C. Após a incubação, 100 μ L das bactérias eletroporadas foram plaqueados em ágar LB com ampicilina (50 μ g/mL) e canamicina (50 μ g/mL), e incubados a 37 °C durante a noite.

3.4. Extração de plasmídeos

A extração de plasmídeos foi realizada através do método de minipreparação de plasmídeos, descrito em Sambrook e Russell (Sambrook and Russell 2001). Um volume de 1,5 mL de *E. coli* S17-1 λ pir transformada crescida em caldo LB contendo ampicilina (50 μ g/mL) e canamicina (50 μ g/mL) foram centrifugados a 13.400 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi suspenso em 100 μ L da solução I (glicose 0,9%; Tris 0,3% e EDTA 0,37% - m/v). No gelo, 200 μ L da solução II (SDS 1% - m/v - e NaOH 0,2 M - preparada na hora) foram adicionados, e o tubo foi invertido 5 vezes. Depois, foram adicionados 150 μ L da solução III (ácido acético glacial 11,5% - v/v - e

acetato de potássio 29,5% - m/v), e o tubo foi invertido 5 vezes novamente. A amostra foi mantida no gelo por 5 minutos e centrifugada por 5 minutos a 13.400 x g. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo, onde foram adicionados 450 µL de clorofórmio, seguido de agitação em vórtex e centrifugação a 13.400 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo, onde o DNA foi precipitado com um mesmo volume de isopropanol, seguido por agitação em vórtex e centrifugação a 13.400 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi lavado com etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 13.400 x g por 2 minutos. O sedimento foi seco e ressuspenso em 30 µL de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) e 1 µL de RNase 20 mg/mL. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) submetido a 100 V por cerca de 1 hora.

3.5. Conjugação

Para a conjugação, 400 µL de inóculo da cepa *E. coli* S17-1 λ pir transformada e 400 µL de inóculo da cepa MT78 foram misturados e centrifugados a 13.400 x g por 1 minuto. O sedimento foi suspenso em 10 µL de solução salina. O homogeneizado de bactérias foi plaqueado no centro de uma placa de ágar LB sem antibióticos. A placa foi incubada a 37 °C por 6 horas (com o ágar para baixo). Após a incubação, as colônias foram coletadas, suspensas em 100 µL de solução salina e plaqueadas em ágar MacConkey com canamicina (50 µg/mL) e ácido nalidíxico (30 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

3.6. Teste de sensibilidade à ampicilina

Uma alíquota de 100 µL dos mutantes foi inoculada em 5 mL de caldo LB contendo 50 µg/mL de ampicilina. Após 18 h, foi verificado o crescimento, ou não, do mutante.

3.7. Organização da biblioteca de mutantes

Os 90 plasmídeos utilizados são nomeados por uma letra de A a H, seguida de um número, de 1 a 12, da mesma forma que os poços de uma microplaca de 96 poços. Noventa amostras de *E. coli* S17-1 λ pir foi transformadas com cada um dos 90 plasmídeos. Cada *E. coli* S17-1 λ pir transformada foi conjugada com a MT 78. Do resultado de cada conjugação, 20 colônias foram selecionadas aleatoriamente, totalizando 20 x 90 mutantes. Cada grupo de 90 mutantes, contendo 90 tags diferentes, foi armazenado em uma microplaca de 96 poços, formando um *pool*. Foram confeccionados, portanto, 20 *pools* de mutantes, que foram numerados de 1 a 20. As amostras do *pool* 1 são denominadas 1A1, 1A2, ..., 1H6; as do *pool* 20, 20A1, 20A2, ..., 20H6.

3.8. Cultura de fibroblastos

Foi cultivada, *in vitro*, uma linhagem transfectada estável de fibroblastos embrionários aviários, CEC-32 (Kaden, et al. 1982) – doados pelo Prof. Bernd Kaspers (Universidade de Munique, Munique, Alemanha) – para uso nos ensaios de invasão com os mutantes. Essas células foram usadas como um modelo de células não-fagocitárias (Matter, et al. 2011). As células foram mantidas em estufa úmida, a 37 °C com 5% de CO₂, em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. O

cultivo se deu em garrafas de cultura com superfície de 25 cm² ou 75 cm², de acordo com a quantidade de células. Para os experimentos, foram plaqueadas 2 x 10⁵ células por poço, em placas de 24 poços, para atingir, após dois dias, um total aproximado de 5 x 10⁵ células por poço, ideal para os ensaios de invasão (Matter, et al. 2011).

3.9. Ensaios de invasão

Foram realizados ensaios de invasão das células CEC-32 utilizando-se os 20 *pools* de mutantes. Para cada *pool*, os mutantes foram multiplicados individualmente, em caldo LB com canamicina (50 µg/mL) e ácido nalidíxico (30 µg/mL), em uma placa de 96 poços, durante a noite (Li, et al. 2005). Depois, o *pool* de mutantes foi misturado e multiplicado em erlenmeyer, a 37 °C sob agitação de 200 rev/min, até o início da fase exponencial (densidade óptica de aproximadamente 0,4 com $\lambda = 600$ nm), quando o número de bactérias por mL de inóculo é de aproximadamente 2 x 10⁸. Uma alíquota de 100 µL do inóculo foi plaqueada em ágar LB com canamicina (50 µg/mL) e ácido nalidíxico (30 µg/mL) para a obtenção dos mutantes presentes no *pool* de infecção.

Foi feito o cálculo para multiplicidade de infecção (MOI) de 200 bactérias por célula. O volume desejado de bactérias foi centrifugado a 4.000 x g por 10 minutos, e o sedimento foi ressuspendido em um determinado volume de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, de modo que cada poço de células fosse infectado com 100 µL da suspensão. As células foram lavadas com PBS e infectadas com um total de 500 µL de meio, com ou sem bactérias (controles), e incubadas por 1 hora em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂. Após esse

tempo, o meio foi removido, e as células foram lavadas três vezes com PBS. Foram adicionados 500 µL de meio com 50 µg/mL de gentamicina, para matar qualquer bactéria que tenha permanecido extracelular. As células foram incubadas por mais 3 horas e então lisadas com Triton X-100 (Sigma, Streinheim, Alemanha) 1% (v/v) por 5 minutos à temperatura ambiente (Matter, et al. 2011). O lisado foi plaqueado nas concentrações de 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} , em ágar LB com canamicina (50 µg/mL) e ácido nalidíxico (30 µg/mL), para a obtenção de amostras dos mutantes capazes de invadir os fibroblastos (*pool* de recuperação). As colônias obtidas no plaqueamento de concentração 10^0 foram coletadas para a extração de DNA. As demais concentrações foram utilizadas para contagem.

3.10. Extração de DNA

O DNA dos *pools* de infecção e recuperação foi extraído individualmente, de acordo com protocolo cedido pelo Dr. Ganwu Li (Universidade de Iowa, Aimes, EUA). Todas as colônias de um mesmo *pool* foram suspendidas em 5,67 mL de TE, e homogeneizadas por pipetagem. Foram adicionados 30 µL de SDS 10% e 30 µL de proteinase K (20 mg/mL), seguido de incubação por 1 hora a 37 °C. Após, 1 mL de NaCl 5 M foi adicionado, e 800 µL de CTAB/NaCl (10% CTAB e 4,1% NaCl – m/v), seguido de incubação a 65 °C por 10 minutos. Então, um isovolume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi adicionado, e a amostra foi centrifugada por 15.000 x g por 6 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado um isovolume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi, novamente, transferido a um novo tubo, ao qual

foi adicionado 60% do volume de isopropanol, seguido de homogeneização e centrifugação a 1.000 x g por 1 min, à temperatura ambiente. O sedimento foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após secar, o DNA precipitado foi suspenso em 100 µL de TE, a 4 °C durante a noite, e armazenado a -20 °C.

3.11. Amplificação das *tags* dos *pools*

As *tags* dos 40 *pools* (20 de infecção e 20 de recuperação) foram amplificadas por PCR, de acordo com as condições descritas por Antão e colaboradores (Antao, et al. 2009a). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar todas as *tags* foram P2 5' TACCTACAACCTCAAGCT 3' e P4 5' TACCCATTCTAACCAAGC 3' (Li, et al. 2005). O resultado da reação de amplificação foi visualizado em gel de agarose 2% (m/v) submetido a 60 V por cerca de 90 minutos.

3.12. Síntese de *tags* marcadas

Após a reação de PCR e amplificação das *tags* de cada *pool*, uma nova reação de PCR foi realizada, nas mesmas condições, porém com a utilização do PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science, Alemanha). O objetivo dessa reação foi a síntese de *tags* com dUTP marcado com digoxigenina, de modo que essas possam ser reconhecidas nas etapas posteriores (Li, et al. 2005).

3.13. Isolamento das *tags*

Após a marcação com digoxigenina, as *tags* foram separadas de sua região flanqueadora através da digestão pela enzima de restrição HindIII (Promega Biotecnologia do Brasil, Brasil), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, em um volume total de 400 μ L por reação. Após incubação durante a noite, as amostras de DNA digerido foram precipitadas em 0,3 M de acetato de sódio pH 5,2 e 2,5 volumes de isopropanol gelado, seguido de centrifugação a 16.000 x *g* por 10 minutos a 0 °C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após secar, o DNA precipitado foi ressuspensionado em 20 μ L de TE. Para isolar somente a *tag*, a amostra de DNA digerido foi submetida a eletroforese em gel de NuSieve GTG agarose (Lonza BioResearch, EUA) 4%, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a visualização das bandas em luz UV, a porção de gel contendo somente a *tag* foi excisada, utilizando-se um estilete, e armazenada a 4 °C.

3.14. Confeção das membranas para hibridização DNA-DNA

Para as reações de hibridização DNA-DNA, foram preparadas 30 membranas de *nylon* (GE nylon, Positively Charged Transfer Membrane). O DNA fixado às membranas foi o das *tags* amplificadas e desnaturadas (10 minutos a 95 °C), através da mesma reação de PCR descrita no item 3.11, porém nesta etapa o DNA molde constituiu-se dos 90 plasmídeos extraídos das diferentes S17-1 *λ pir* transformadas, permitindo que cada *tag* fosse amplificada individualmente. O desenho de uma placa de 96 poços foi feito a lápis nas membranas, com divisões de 0,8 cm². Quatro microlitros de cada uma das *tags* amplificadas foram pipetados

nos seus espaços correspondentes nas membranas, que foram submetidas à temperatura de 80 °C por 2 horas, para a fixação do DNA.

3.15. Hibridização DNA-DNA

Utilizando-se as membranas de *nylon* com o DNA das *tags* fixado e as *tags* marcadas com digoxigenina e isoladas, foi realizada uma reação de hibridização de DNA-DNA para cada *pool* de infecção e de recuperação. As membranas foram pré-hibridizadas por 2 horas, a 42 °C e agitação de 6 rpm, com 10 mL de tampão de pré-hibridização. Para a utilização das *tags* na hibridização, a porção de gel contendo-as foi aquecida a 95 °C por 5 minutos e imediatamente incubada no gelo por 5 minutos. Após, a porção de gel re-solidificada foi misturada ao tampão de pré-hibridização e a 10 µL de cada um dos oligonucleotídeos P2 e P4 (1 nmol), formando o tampão de hibridização. As membranas foram incubadas com esse tampão por 16 horas, a 42 °C com agitação constante de 6 rpm. Após, foram lavadas duas vezes com o tampão estrigente I, por 5 minutos a temperatura ambiente, e duas vezes com o tampão estrigente II, por 15 minutos a 68 °C.

Soluções utilizadas:

- * Tampão de pré-hibridização: 5 X SSC, 50% formamida, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS, 2% Blocking reagent (fornecido no DIG Nucleic Acid Detection kit – Roche Applied Science, Alemanha) em água;
- * Tampão estrigente I: 2 X SSC, 0,1% SDS em água;
- * Tampão estrigente II: 0,1 X SSC, 0,1% SDS em água.

3.16. Detecção das *tags* nas membranas

Foi utilizado o DIG Nucleic Acid Detection kit (Roche Applied Science, Alemanha), seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante. O protocolo constitui-se de duas etapas; na primeira delas, ocorre a ligação de um anticorpo monoclonal anti-digoxigenina às moléculas de digoxigenina presentes no DNA das *tags* marcadas, oriundas dos *pools* de infecção e recuperação, que se ligaram às *tags* presentes na membrana (sem marcação). Na segunda etapa, após a ligação do anticorpo, um substrato e uma solução reveladora são adicionados ao sistema, produzindo uma reação colorimétrica nos locais onde o anticorpo se ligou. A coloração azul é indicativa de que houve a ligação do anticorpo, ou seja, indica a presença de determinada *tag* na amostra.

3.17. Determinação da concentração de DNA

Em diversas etapas do trabalho foram realizadas medições de concentração e pureza das amostras de DNA. Foi utilizado o volume de 1 μ L por amostra, e as leituras foram realizadas no equipamento Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA), do Laboratório de Imunogenética da UFRGS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção da biblioteca de mutantes

Uma biblioteca de 1.800 mutantes foi construída por eletroporação e conjugação. Noventa vetores pUTmini-Tn5km2 contendo 90 diferentes *tags* foram inseridos em 90 amostras da cepa S17-1 *λpir*. Essa inserção foi verificada através da resistência das amostras eletroporadas aos antimicrobianos ampicilina e canamicina – cujos genes de resistência estão codificados no vetor – e através da extração de plasmídeos dessas amostras.

Os vetores foram transferidos para 90 amostras da cepa MT78 através de conjugação. Foram feitas modificações no protocolo descrito por Li e colaboradores (Li, et al. 2005), já que o tempo de incubação de 8 horas não se mostrou efetivo. Foram testados os tempos de 4 h, 6 h, 10 h e 12 h, e o tempo de 6 h de incubação foi o único que se mostrou eficaz no processo de conjugação. Além disso, em vez de ágar LB, foi utilizado o ágar MacConkey, pois nesse meio as colônias da cepa MT78 apresentam coloração diferente daquela apresentada pelas colônias de S17-1 *λpir* facilitando a escolha dos mutantes. O rendimento das conjugações foi entre 100 e 1.000 unidades formadoras de colônia (UFC). Não houve crescimento nos controles. Vinte mutantes de cada conjugação foram aleatoriamente selecionados e armazenados em placas de 96 poços, de acordo com o código de cada um. Pelo menos um mutante de cada conjugação foi testado quanto a suscetibilidade à ampicilina, já que, após a conjugação, o plasmídeo – com a marca de resistência à ampicilina – não se replica na MT78, e somente o transposon – com a marca de resistência à canamicina – deve

integrar-se ao genoma. Nenhum mutante testado demonstrou resistência à ampicilina, o que confirma o resultado esperado, já que após a conjugação o plasmídeo não se replica.

4.2. Ensaio de seleção dos mutantes

Para cada *pool* de mutantes, foi realizado um ensaio de invasão a fibroblastos aviários, em triplicata. As triplicatas mostraram resultados semelhantes. As contagens de mutantes recuperados em cada ensaio de invasão são apresentadas na tabela 1. O número de mutantes recuperados é semelhante ao apresentado por Li e colaboradores (Li, et al. 2005). Os controles não apresentaram crescimento.

4.3. Padronização das técnicas de biologia molecular após os ensaios de seleção

O DNA de cada *pool* de mutantes foi extraído conforme descrito (Seção 3.10). As concentrações de cada amostra são apresentadas na tabela 2, e estão de acordo com os pré-requisitos do PCR DIG Probe Synthesis Kit. Após a extração, foi realizada uma reação de PCR para amplificar somente as *tags*. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 60 V por cerca de 60 minutos (**Figura 3**).

Após, as amostras foram submetidas a uma segunda reação de PCR, com a utilização do PCR DIG Probe Synthesis Kit, para marcar as *tags* com digoxigenina. Também foi realizada eletroforese em gel de agarose para confirmar o sucesso da marcação (**Figura 4**).

Tabela 1. Número médio de mutantes recuperados nas triplicatas (\pm desvio padrão) e número de mutantes recuperados para cada célula eucariótica (\pm desvio padrão), nos ensaios de invasão. O número de células eucarióticas variou entre os experimentos.

Pool	Nº de mutantes recuperados	Nº de mutantes por célula
1	$20,5 \times 10^4 \pm 21,2 \times 10^4$	$4,36 \pm 4,5$
2	$10,4 \times 10^4 \pm 22 \times 10^4$	$2,21 \pm 0,47$
3	$23,2 \times 10^4 \pm 11,9 \times 10^4$	$4,94 \pm 2,52$
4	$16,3 \times 10^4 \pm 2,23 \times 10^4$	$3,47 \pm 0,48$
5	$20,6 \times 10^4 \pm 11,4 \times 10^4$	$4,38 \pm 2,43$
6	$22,9 \times 10^4 \pm 3,28 \times 10^4$	$4,88 \pm 0,7$
7	$13,3 \times 10^4 \pm 0,95 \times 10^4$	$2,66 \pm 0,19$
8	$1,3 \times 10^4 \pm 2,65 \times 10^4$	$0,98 \pm 0,6$
9	$2 \times 10^4 \pm 1,62 \times 10^4$	$0,45 \pm 0,17$
10	$10^4 \pm 0,24 \times 10^4$	$0,25 \pm 0,06$
11	$2,7 \times 10^4 \pm 0,39 \times 10^4$	$0,67 \pm 0,1$
12	$0,6 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$	$0,15 \pm 0,13$
13	$0,8 \times 10^4 \pm 0,18 \times 10^4$	$0,20 \pm 0,05$
14	$1,2 \times 10^4 \pm 0,66 \times 10^4$	$0,25 \pm 0,13$
15	$1,7 \times 10^4 \pm 1,29 \times 10^4$	$0,35 \pm 0,26$
16	$0,6 \times 10^4 \pm 0,14 \times 10^4$	$0,12 \pm 0,03$
17	$13,4 \times 10^4 \pm 13 \times 10^4$	$2,69 \pm 2,59$
18	$17,1 \times 10^4 \pm 13,6 \times 10^4$	$3,41 \pm 2,72$
19	$9,1 \times 10^4 \pm 6,98 \times 10^4$	$1,82 \pm 1,4$
20	$16 \times 10^4 \pm 10,2 \times 10^4$	$3,19 \pm 2,04$

Tabela 2. Concentração e pureza (relação 260/280 nm) das amostras de DNA extraídas de cada *pool* de mutantes. Na tabela, Input = *pool* de infecção; Output = *pool* de recuperação.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (260/280 nm)
Output1	4042,9	2,03
Input1	2023,2	2,12
Output2	1052,9	2,13
Input2	386,6	2,07
Output3	268,9	2,07
Input3	456,7	2,04
Output4	291,5	2,03
Input4	253,1	2,03
Output5	1056,7	2,1
Input5	420,8	2,03
Output6	407,8	2,03
Input6	1034,4	2,1
Output7	336,2	2,05
Input7	110,5	2,04
Output8	234,7	1,99
Input8	139,7	1,96
Output9	4267,2	1,84
Input9	3004,6	1,94
Output10	1755,5	2,01
Input10	2995,4	2,04
Output11	846,2	2,15
Input11	836,8	2,12
Output12	1169,7	2,15
Input12	1147,5	2,08
Output13	3456,4	2,08
Input13	1682,9	2,13
Output14	2187,2	2,12
Input14	2064,2	2,12
Output15	2683,4	2,11
Input15	3570,1	2,01
Output16	2623,6	1,88
Input16	1865,3	1,98
Output17	1282	2,11
Input17	434	2,05
Output18	76,8	2,12
Input18	64,1	2,13
Output19	36,2	2,18
Input19	34,2	2,14
Output20	26,6	2,17
Input20	17,4	2,3

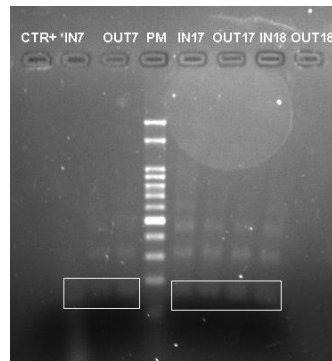


Figura 3. Gel mostrando a amplificação das *tags* dos *pools* de infecção (IN) e recuperação (OUT) 7, 17 e 18. A coluna PM representa o padrão de tamanho molecular, no qual a banda mais forte corresponde a 250 pb, com outras bandas aparecendo a cada 50 pb. As bandas marcadas, que representam as *tags*, estão na posição equivalente a 80 pb (*tag* de 40 pb mais regiões flanqueadores de 20 pb).



Figura 4. Gel com as *tags* marcadas com digoxigenina dos *pools* de infecção (IN) e recuperação (OUT) 7, 8 e 9. O padrão de tamanho molecular (PM) desse gel é o mesmo descrito na Figura 3.

As *tags* marcadas foram digeridas utilizando-se a enzima de restrição HindIII, para a remoção das sequências flanqueadoras. Após a digestão, o DNA foi precipitado, e uma nova eletroforese foi realizada (**Figura 5**), porém utilizando-se agarose GTG NuSieve 4%, conforme descrito por Li e colaboradores (Li, et al. 2005). As bandas centrais, que representam *tags* digeridas, foram excisadas do gel e utilizadas na hibridização DNA-DNA.

4.4. Identificação dos mutantes com virulência atenuada através de hibridização DNA-DNA

Para padronizar a hibridização DNA-DNA, foram feitas diversas tentativas, com membranas de *nylon* preparadas em diferentes datas, com diferentes concentrações de anticorpo anti-digoxigenina e com diferentes condições de hibridização. Entretanto, as condições mais adequadas foram as recomendadas pelo DIG Nucleic Acid Detection kit.

Dos 20 *pools* desse trabalho, 11 já foram analisados (a **Figura 6** exemplifica a análise de um *pool*, e as tabelas 3 a 12 resumem todos os resultados), sendo que um deles, o *pool* 10, não apresentou nenhum mutante ausente na hibridização DNA-DNA (tabela não mostrada). Até o momento, 48 mutantes emitiram sinal na hibridização do *pool* de infecção, mas não na hibridização do *pool* de recuperação. Esse resultado será confirmado em um novo teste a ser realizado utilizando-se esses mutantes, para que se possa afirmar que eles sofreram atenuação da virulência.

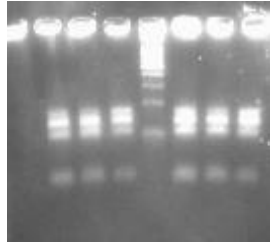


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose GTG NuSieve 4% das *tags* digeridas pela enzima de restrição HindIII. Ordem das canaletas: controle negativo, *pool* de infecção 3, *pool* de recuperação 3, *pool* de infecção 4, padrão de peso molecular de 50 pb, *pool* de recuperação 4, *pool* de infecção 5 e *pool* de recuperação 5. Três bandas podem ser observadas em cada amostra, entre as bandas de 50 pb e 100 pb do padrão de peso molecular. A banda superior representa *tags* com regiões flanquadoras que não foram digeridas (80 pb); a banda central representa *tags* que foram digeridas (40 pb); a banda inferior representa as sequências flanqueadoras digeridas (20 pb). A marcação com digoxigenina torna a migração dos fragmentos anômala, um pouco mais lenta.

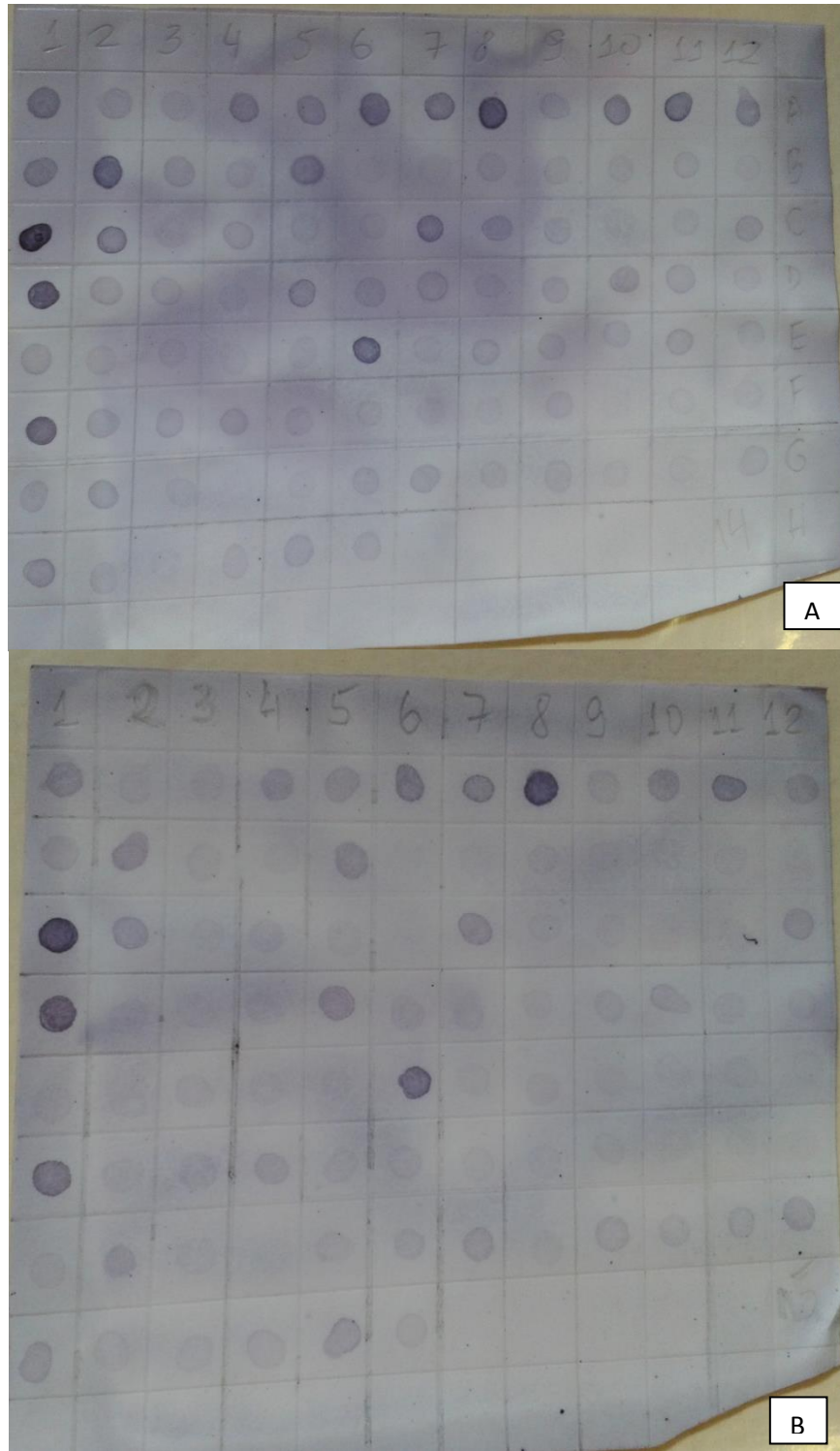


Figura 6. A. Hibridização DNA-DNA do *pool* de infecção 11. Cada *blot* azul indica sinal positivo para a presença da *tag* na amostra. Nessa amostra todos as *tags* emitiram sinal, ou seja, todos os 90 mutantes estavam presentes nesse *pool*. B.

Hibridização DNA-DNA do *pool* de recuperação 11. Nessa amostra 86 *tags* emitiram sinal, ou seja, 86 mutantes estavam presentes nesse *pool*. Mutantes ausentes: B6, B12, C6 e C10.

Tabela 3. Resultado da hibridização do *pool* 3. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						

Tabela 4: Resultado da hibridização do *pool* 4. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
F	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	-	-	+	+	+						

Tabela 5: Resultado da hibridização do *pool* 6. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	-	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
C	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
G	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
H	+	-	+	+	+	-						

Tabela 6: Resultado da hibridização do *pool* 7. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
C	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
D	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						

Tabela 7: Resultado da hibridização do *pool* 8. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	-	+	-	-	+	+						

Tabela 8: Resultado da hibridização do *pool* 9. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						

Tabela 9: Resultado da hibridização do *pool* 11. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						

Tabela 10: Resultado da hibridização do *pool* 15. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						

Tabela 11: Resultado da hibridização do *pool* 18. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						

Tabela 12: Resultado da hibridização do *pool* 20. Placa de 96 poços superior: *pool* de infecção; placa de 96 poços inferior: *pool* de recuperação.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
D	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
G	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
H	+	+	+	+	+	+						

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Até o momento, o presente trabalho padronizou as técnicas exigidas em todas as etapas necessárias para a identificação de mutantes atenuados, gerados pela técnica de STM, faltando apenas as hibridizações dos demais *pools* para que a etapa de identificação dos mutantes seja concluída.

Em seguida, todos os possíveis mutantes de virulência atenuada serão reorganizados em novos *pools* e testados novamente no mesmo modelo de seleção. Aqueles mutantes que mais uma vez emitirem sinal na hibridização do *pool* de infecção, mas não na do *pool* de recuperação serão considerados mutantes com virulência atenuada.

Esses mutantes terão seu genoma fragmentado por enzimas de restrição, e será realizada a hibridização desses fragmentos com a sequência do gene de resistência à canamicina, presente no transposon que causou a mutação atenuadora. O(s) fragmento(s) contendo esse gene será(ão) clonado(s) em um vetor e sequenciado(s), a fim de identificar o gene interrompido. Ferramentas de bioinformática, ensaios fenotípicos *in vitro*, e até mesmo ensaios de virulência *in vivo* poderão ser usados na caracterização do(s) gene(s) encontrado(s).

O que se espera, após a conclusão dessa etapa do trabalho, é (1) a identificação de genes associados à virulência de APEC já descritos; (2) a identificação de genes com função atribuída para outras bactérias, mas não conhecidos por estarem envolvidos na virulência de APEC; (3) a identificação de novos genes para ExPEC, que sejam essenciais para o estabelecimento da infecção e contribuam para aumentar a virulência de APEC.

Outros modelos de seleção também poderão ser utilizados para essa mesma biblioteca de mutantes. Recentemente, descreveu-se uma linhagem de células de pulmão de galinha (Esnault, et al. 2011), que pode mostrar-se promissora para responder as perguntas que motivaram o desenvolvimento deste trabalho. Também poderá ser realizada a seleção em modelo de infecção *in vivo*, de modo a aumentar as formas de pressão do hospedeiro e expandir a gama de perguntas com potencial de serem respondidas.

REFERÊNCIAS

Agüero, M. E., et al.

1984 A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infection and Immunity* 46:740-746.

ALLAN, BJ, JV VANDENHURK, and AA POTTER

1993 CHARACTERIZATION OF ESCHERICHIA-COLI ISOLATED FROM CASES OF AVIAN COLIBACILLOSIS. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 57(3):146-151.

Alves, J.M.d.S., O. Martinelli, and H. Dewes

2006 Dinâmica inovativa no agronegócio: a inovação tecnológica na avicultura industrial por meio da análise de patentes. *Cadernos de Ciência & Tecnologia* 23:207-233.

Antao, EM, et al.

2009a Signature-Tagged Mutagenesis in a Chicken Infection Model Leads to the Identification of a Novel Avian Pathogenic *Escherichia coli* Fimbrial Adhesin. *Plos One* 4(11).

Antao, EM, LH Wieler, and C Ewers

2009b Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens* 1.

Arné, P., et al.

2000 Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion. *Avian Diseases* 44:343-355.

Arrecubieta, C, et al.

2001 The transport of group 2 capsular polysaccharides across the periplasmic space in *Escherichia coli* - Roles for the KpsE and KpsD proteins. *Journal of Biological Chemistry* 276(6):4245-4250.

Barbieri, N. L., et al.

2013 Genotypes and in vivo pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. submitted manuscript.

Barnes, H. J., J. P. Vaillancourt, and W. B. Gross

2003 Colibacillosis. *In Diseases of Poultry*. Hofstad, ed. Pp. 631-656. Iowa: Iowa State University Press.

Bliss, J. M., C. F. Garon, and R. P. Silver

1996 Polysialic acid export in *Escherichia coli* K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation. *Glycobiology* 6:445-452.

Bonacorsi, S., et al.

2003 Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *The Journal of Infectious Diseases* 187(12):1895-1906.

Brasil

1998 Portaria Nº 210, DE 10 DE NOVEMBRO DE 1998 Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. D.O.d.R.F.d. Brasil, ed. Brasília.

BREE, A, M DHO, and JP LAFONT

1989 COMPARATIVE INFECTIVITY FOR AXENIC AND SPECIFIC-PATHOGEN-FREE CHICKENS OF O2 ESCHERICHIA-COLI STRAINS WITH OR WITHOUT VIRULENCE FACTORS. *Avian Diseases* 33(1):134-139.

Caza, Mélissa, François Lépine, and Charles M. Dozois

2011 Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 80(1):266-282.

Caza, Melissa, et al.

2008 Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infection and Immunity* 76(8):3539-3549.

CHEVILLE, NF, and LH ARP

1978 COMPARATIVE PATHOLOGIC FINDINGS OF ESCHERICHIA-COLI INFECTION IN BIRDS. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173(5):584-587.

Cortes, M. A., et al.

2008 Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infection and Immunity* 76:4129-4136.

de Brito, BG, LCJ Gaziri, and MC Vidotto

2003 Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infection and Immunity* 71(7):4175-4177.

De Lorenzo, Victor, et al.

1990 Mini-Tn5 Transposon Derivates for Insertion Mutagenesis, Promoter Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria. *Journal of Bacteriology* 172(11):6568-6572.

De Lorenzo, Victor, and Kenneth N. Timmis

1994 Analysis and Construction of Stables Phenotypes in Gram-Negative Bacteria with Tn5- and Tn10-Derivated Minitransposons. *In Genetics and Regulation*. Pp. 386 - 405.

De Ricke, J., A. Milon, and E. Oswald

1999 Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary Research* 2(3):299-316.

Dho-Moulin, M, and JM Fairbrother

1999 Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* 30(2-3):299-316.

Dho, M., and J. P. Lafont

1984 Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Diseases* 28:1016-1025.

Dho, Maryvonne, and J. P. Lafont

1982 *Escherichia coli* Colonization of the Trachea in Poultry: Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens. *Avian Diseases* 26(4):787-797.

Dozois, C. M., et al.

2000 Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infection and Immunity* 68:4145-4154.

Dziva, Francis, and Mark P. Stevens

2008 Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology* 37(4):355- 366.

Esnault, Evelyne, et al.

2011 A novel chicken lung epithelial cell line: Characterization and response to low pathogenicity avian influenza virus. *Virus Research* 159(1):32-42.

Ewers, C, et al.

2007 Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology* 297(3):163-176.

Ewers, C., et al.

2009 Intestine and Environment of the Chicken as Reservoirs for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains with Zoonotic Potential. *Applied Environmental Microbiology* 75(1):184-192.

Falkow, S.

1991 Bacterial Entry into Eukaryotic Cells. *Cell* (65):1099-1102.

Fallavena, L.C.B., et al.

2000 Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses - a microscopic and macroscopic study. *Avian Pathology* 29: 557-562.

Ferreira, A. J., and T. Knöbl

2000 Colibacilose aviária. *In Doenças das Aves*. A.M. Berchieri, M., ed. Pp. 197-205. Campinas: FACTA.

Finlay, B. B., and S. Falkow

1997 Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(2):136-169.

Fleckenstein, J. M., et al.

1996 Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 64(22):2256-2265.

Germon, P., et al.

2005 *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 151:1179-1186.

Gross, W. B.

1961 The development of "air sac disease". *Avian Diseases* 5:431-439.

Guyer, D. M., et al.

2000 Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 38(1):53-66.

Han, X, et al.

2013 **The luxS gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli***. *Microbial Pathogenesis* 55:21-27.

Heimer, S. R., et al.

2004 Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity* 72:593-597.

Hensel, Michael, et al.

1995 Simultaneous Identification of Bacterial Virulence Genes by Negative Selection. *Science* 269:400-403.

Horn, F., et al.

2012 Infections with Avian Pathogenic and Fecal *Escherichia coli* Strains Display Similar Lung Histopathology and Macrophage Apoptosis. *Plos One* 7(7):11.

Horn, Fabiana, et al.

2007 Colonization of chicken lung by avian pathogenic strains of *Escherichia coli* is accompanied by apoptosis. *In X IUBMB Conference e XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology*. Salvador, Brazil.

Johnson, J. R., and T. A. Russo

2005 Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295:383-404.

Johnson, Timothy J., Sara J. Johnson, and Lisa K. Nolan

2006 Complete DNA Sequence of a ColBM Plasmid from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Suggests that It Evolved from Closely Related ColV Virulence Plasmids. *Journal of Bacteriology* 188(16):5975-5983.

Johnson, TJ, et al.

2007 The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1 : K1 : H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic E-coli genomes (vol 189, pg 3228, 2007). *Journal of Bacteriology* 189(12):4554-4554.

Kaaden, O.R., S. Lange, and B. Stiburek

1982 Establishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32. *In Vitro* 18(10):827-834.

Kaper, James B., James P. Nataro, and Harry L. T. Mobley

2004 Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews - Microbiology* 2:123-140.

Kariyawasam, S., et al.

2006 Occurrence of pathogenicity island I (APEC-O1) genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. *Avian Diseases* 50:405-410.

Kim, Kwang Sik

2001 *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infection and Immunity* 69:5217-5222.

—

2003 Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nature Reviews - Neuroscience* 4:376-385.

—

2008 Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. *Nature Reviews - Microbiology* 6:625-634.

Klemm, Per, Viktoria Hancock, and Mark A. Schembri

2010 Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*.
Environmental Microbiology Reports 2(5):628-640.

Knobl, T, et al.

2012 Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone
Harboring *sfa* Gene in Brazil. Scientific World Journal.

La Ragione, RM, and MJ Woodward

2002 Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian
colisepticaemia. Research in Veterinary Science 73(1):27-35.

Li, Ganwu, et al.

2005 Identification of Genes Required for Avian *Escherichia coli*
Septicemia by Signature-Tagged Mutagenesis. Infection and Immunity
73(5):2818-2827.

Li, GW, et al.

2011 Transcriptome Analysis of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O1 in
Chicken Serum Reveals Adaptive Responses to Systemic Infection.
Infection and Immunity 79(5):1951-1960.

Matter, L. B., et al.

2011 Avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts.
Veterinary Microbiology 148(1):51-59.

Mazurkiewicz, Piotr, et al.

2006 Signature-tagged mutagenesis: barcoding mutants for genome-wide
screens. Nature Reviews - Genetics 7:929-939.

Mellata, M., et al.

2003a Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to Serum and in Pathogenicity. *Infection and Immunity* 71(1):536-540.

—

2003b Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity* 71:494-503.

Moulin-Schouler, M., et al.

2006 Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology* 44:3484-3492.

Nagai, S., T. Yagihashi, and A. Ishihama

1998 An avian pathogenic *Escherichia coli* strain produces a hemolysin, the expression of which is dependent on cyclic AMP receptor protein gene function. *Veterinary Microbiology* 60:227-238.

NCBI

2013a *E. coli* Genomes, Vol. 2013.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=167.

—

2013b Microbial Genomes, Vol. 2013.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html.

Nolan, L. K., et al.

2003 Resistance to serum complement, *iss* and virulence of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Research Communications* 27:101-110.

Parreira, V. R., and C. L. Gyles

2003 A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infection and Immunity* 71(9):5087-5096.

Pourbakhsh, Seyed Ali, et al.

1997a Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Veterinary Microbiology* 58:195 - 213.

—

1997b Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Veterinary Microbiology* 58:195-213.

Pramoonjago, P., et al.

1992 Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. *Journal of Immunology* 148:827-836.

Provence, D. L., and R. Curtiss

1994 Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity* 62(4):1369-1380.

Raskin, D. M., et al.

2006 Bacterial genomics and pathogen evolution. *Cell* 124(4):703-714.

Reis, Roberta Souza, and Fabiana Horn

2010 Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathogens* 2(8).

Russo, T. A., U. B. Carlino, and J. R. Johnson

2001 Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 69(10):6209-6216.

Sabri, M., et al.

2008 Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infection and Immunity* 76:601-611.

Sambrook, Joseph, and David W. Russell

2001 Plasmids. *In* *Molecular Cloning - A laboratory manual*. C.S. Harbor, ed. New York.

Sauer, F. G., et al.

2000 Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 3:65-72.

Skyberg, J. A., et al.

2006 Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity* 74:6287-6292.

Smith, S. G. J., et al.

2007 A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiology Letters* 273:1-11.

Sorsa, L. J., et al.

2003 Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infection and Immunity* 71:3285-3293.

Stathopoulos, C., D. L. Provence, and R. Curtiss

1999 Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infection and Immunity* 67(2):772-781.

Stawski, G., et al.

1990 Serum sensitivity of a diversity of *Escherichia coli* antigenic reference strains. Correlation with an LPS variation phenomenon. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 98:828-838.

Stordeur, P., et al.

2004 Pathogenicity of *pap*-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicemic lesions. *Microbes and Infection* 6:637-645.

—

2002 Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli* *Veterinary Microbiology* 84:231-241.

Swaggerty, CL, et al.

2009 Selection of Broilers with Improved Innate Immune Responsiveness to Reduce On-Farm Infection by Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(7):777-783.

Tivendale, K. A., et al.

2004 Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh* with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 72:6554-6560.

UBABEF

2012 Relatório Anual 2012. Brasil.

Van Dijk, W. C., et al.

1979 Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonisation. *Infection and Immunity* 25:603-609.

Vanderkelen, L, et al.

2012 Role of Lysozyme Inhibitors in the Virulence of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Plos One* 7(9).

Vokes, S., et al.

1999 The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. *Molecular Microbiology* 33(1):63-73.

Wang, SH, et al.

2011 Effects of *ibeA* Deletion on Virulence and Biofilm Formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 79(1):279-287.

Zhao, Lixiang, et al.

2009 Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology* 155:1634-1644.

CURRICULUM VITAE

PAVANELO, D. B.

Nome: Daniel Brisotto Pavanelo

Endereço eletrônico: daniel.pavanelo@ufrgs.br

Nascimento: 26 de setembro de 1989, Porto Alegre, RS, Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

2011 Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Confeção e seleção in vitro de mutantes com virulência atenuada de cepa APEC por Mutagênese Marcada com Assinatura, Orientador: Fabiana Horn.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
Palavras-chave: APEC; STM (Signature-Tagged Mutagenesis); Colibacilose aviária; Biologia Molecular; Microbiologia Celular.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Biologia e Fisiologia dos Microorganismos / Especialidade: Interação patógeno-hospedeiro.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Biologia e Fisiologia dos Microorganismos / Especialidade: Bacterologia.

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - 2011 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Pesquisador

Projeto de Pesquisa

2009 - 2012 CONFECÇÃO E SELEÇÃO IN VITRO DE MUTANTES COM VIRULÊNCIA ATENUADA DE CEPA APEC POR MUTAGÊNESE MARCADA COM ASSINATURA

Descrição: APEC (Avian Pathogenic Escherichia coli) é responsável por infecções extra-intestinais em aves, conhecidas como colibacilose. A doença pode instalar-

se em diferentes locais anatômicos da ave e apresentar sintomatologia variada. A manifestação mais grave da doença é a colissepticemia que, geralmente, é iniciada pelo trato respiratório superior e culmina com a morte da ave. A colibacilose tem causado grande prejuízo econômico na indústria avícola devido ao comprometimento no desenvolvimento da ave ou na produção de ovos, ao descarte da carcaça ou pela morte da ave. O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango e o primeiro maior exportador, o que faz com que seja de interesse nacional medidas que garantam a qualidade e a segurança na produção e no produto. O entendimento dos mecanismos celulares e moleculares da doença fornecerão subsídios para o desenvolvimento de formas mais eficientes de combate da doença. Este projeto propõe identificar os genes/proteínas envolvidos no processo de invasão pela APEC MT78 aos fibroblastos aviários (linhagem CEC-32), usando a técnica de STM (Signature-Tagged Mutagenesis). A técnica de STM consiste em um método de mutação aleatória que utiliza sequências construídas e identificáveis, que são inseridas aleatoriamente no DNA genômico através de um transposon. Ela permite a construção de uma biblioteca de mutantes, que serão testados em ensaios de invasão em células não-fagocíticas. O reconhecimento dos mutantes de interesse é feito pela comparação entre os mutantes do inóculo e os mutantes recuperados do experimento de infecção. Os mutantes que apresentarem sinal de hibridização com as sondas do inóculo mas não com as do pool recuperado serão selecionados, os fragmentos nos quais o transposon foi inserido serão seqüenciados e as seqüências analisadas. Neste projeto, estamos propondo uma inovação à técnica original de STM, a qual usa modelo animal (in vivo) e que estamos substituindo pela cultura celular (in vitro) para a recuperação dos mutantes.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) Doutorado: (2)

Integrantes: Daniel Brisotto Pavanelo / Fabiana Horn - Integrante / Letícia Beatriz Matter - Integrante.

Resumos publicados em anais de congressos

1. PAVANELO, D. B. ; MATTER, L. B. ; HORN, F. . Produção de uma biblioteca de 1800 mutantes de *Echerichia coli* patogênica aviária através da técnica de mutagênese marcada com assinatura. In: 26^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. Produção de uma biblioteca de 1800 mutantes de *Echerichia coli* patogênica aviária através da técnica de mutagênese marcada com assinatura, 2011.

Apresentações de Trabalho

1. PAVANELO, D. B. . *Escherichia coli* patogênica aviária: patógeno veterinário de interesse humano. 2012.

(Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2. PAVANELO, D. B. . In vitro selection of non-invasive Avian Pathogenic *Escherichia coli* mutants generated by signature-tagged mutagenesis. 2012.

(Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

3. PAVANELO, D. B. ; matter, L. B. ; HORN, F. . Produção de uma Biblioteca de 1800 mutantes de Escherichia coli patogênica aviária através da técnica de mutagênese marcada por assinatura (STM). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. PAVANELO, D. B. ; HORN, F. ; matter, L. B. . Identificação dos genes da Escherichia coli patogênica aviária envolvidos na invasão de fibroblastos aviários por mutagênese marcada com assinatura. 2010. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
5. PAVANELO, D. B. ; HORN, F. ; matter, L. B. . Confecção e seleção in vitro de mutantes com virulência atenuada de cepa APEC por Mutagênese Marcada com Assinatura. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Outras produções bibliográficas

1. PAVANELO, D. B. ; HORN, F. . Objetos de aprendizagem para disciplinas básicas de Biofísica 2008 (Objeto de aprendizagem para educação à distância).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. International symposium on avian extra-intestinal Escherichia coli. In vitro Selection of non-invasive Avian Pathogenic Escherichia coli mutants generated by signature-tagged mutagenesis. 2012. (Simpósio).
2. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Produção de uma Biblioteca de 1800 mutantes de Escherichia Coli Patogênica Aviária (APEC) através da técnica de Mutagênese Marcada por Assinatura (STM). 2011. (Congresso).
3. III Semana Acadêmica de Biomedicina - UFRGS. 2009. (Outra).
4. II Semana Acadêmica de Biomedicina - UFRGS. 2008. (Outra).
5. II Simpósio sobre Células-Tronco - FFFCMPA. 2007. (Simpósio).
6. I Semana Acadêmica de Biomedicina - UFRGS. 2007. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. FURTADO, G. V. ; PAVANELO, D. B. ; MARCOLIN, M L ; MATTOS, E. P. . III Semana Acadêmica da Biomedicina -UFRGS. 2009. (Outro).

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. PAVANELO, D. B. . Escherichia coli patogênica aviária: patógeno veterinário de interesse humano. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).