



JACQUELINE BOLDRIN DE PAIVA

**“MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA EM UMA LINHAGEM DE
Escherichia coli (APEC) CAUSADORA DE SÍNDROME DE
CABEÇA INCHADA EM AVES: ANÁLISES *IN VITRO* E *IN*
VIVO”**

**“SITE-DIRECTED MUTAGENESIS IN AN AVIAN
PATHOGENIC *Escherichia coli* (APEC) ISOLATED FROM A
SWOLLEN HEAD SINDROME CASE: ANALISIS *IN VITRO* AND
IN VIVO”**

Campinas, 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JACQUELINE BOLDRIN DE PAIVA

“MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA EM UMA LINHAGEM DE *Escherichia coli*
(APEC) CAUSADORA DE SÍNDROME DE CABEÇA INCHADA EM AVES:
ANÁLISES *IN VITRO* E *IN VIVO*”

“SITE-DIRECTED MUTAGENESIS IN AN AVIAN PATHOGENIC *Escherichia coli*
(APEC) ISOLATED FROM A SWOLLEN HEAD SINDROME CASE:
ANALISIS *IN VITRO* AND *IN VIVO*”

Este exemplar corresponde à redação final da TESE defendida pela candidata JACQUELINE BOLDRIN DE PAIVA e aprovada pela comissão julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Thesis subbimeted to the Institute of Biology for obtaining the title of Phd in Genetics and Molecular Biology in the Microbiology area.

Campinas 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P166m Paiva, Jacqueline Boldrin de, 1984-
Mutagênese sítio-dirigida em uma linhagem de *Escherichia coli* (APEC) causadora de síndrome da cabeça inchada em aves : análises *in vitro* e *in vivo* / Jacqueline Boldrin de Paiva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.
Coorientador: Marcelo Brocchi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli* patogênica aviária. 2. Colibacilose. 3. *Escherichia coli* – Patogenicidade. 4. Deleção de genes. 5. Ave. I. Dias da Silveira, Wanderley, 1956-. II. Brocchi, Marcelo, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Site-directed mutagenesis in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from a swollen head syndrome case : analysis *in vitro* and *in vivo*

Palavras-chave em inglês:

Avian pathogenic *Escherichia coli*

Colibacilosis

Escherichia coli - Pathogenicity

Gene deletion

Bird

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Wanderley Dias da Silveira [Orientador]

Marcelo Palma Sircili

Waldir Pereira Elias Junior

Vasco Aristón de Carvalho Azevedo

Tomomasa Yano

Data de defesa: 27-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

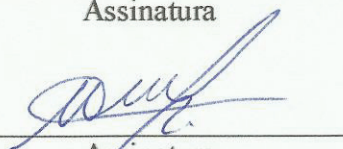
Prof. Dr. Wanderley Dias Da Silveira (orientador)


Assinatura

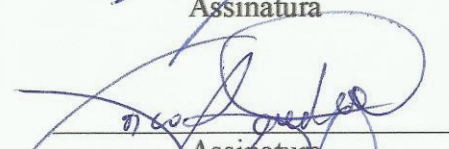
Dr. Marcelo Palma Sircili


Assinatura

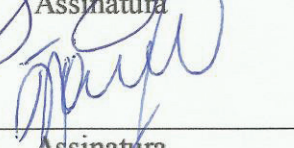
Dr. Waldir Pereira Elias Junior


Assinatura

Prof. Dr. Vasco Aristón de Carvalho Azevedo


Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano


Assinatura

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Assinatura

Dra. Isabel Cristina Aparecida Scaletsky

Assinatura

Profa. Dra. Beatriz Ernestina Cabilio Guth

Assinatura

*Ao meu avô Nivaldo Boldrín para que ele saiba o que nunca me esqueci,
que nenhuma gota de suor, lágrima ou sangue foi derramada em vão, pois
aqui permaneço eu, como sua extensão, como sua continuidade, colhendo
os frutos da hombridade do seu trabalho,*

Dedico...

"Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso".

(Ralph Waldo Emerson)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me proporcionado saúde, energia, entusiasmo e perseverança para desenvolver este trabalho.

Em segundo lugar, ao Professor Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela oportunidade de integrar seu grupo e desenvolver este trabalho que me fez crescer muito, pessoal e profissionalmente.

À FAPESP (processo n° 2010/50596-9) e ao CNPq (processo n° 141069/2010-4), por terem confiado em nós e financiado este trabalho.

Aos meus pais, especialmente a minha mãe Lucí, pelos esforços em me criar e educar.

Aos meus irmãos, especialmente a minha irmã Fernanda, pela doçura, amizade e parceria.

Ao meu amado Angelo, por seu amor, cuidado, amizade, parceria e principalmente paciência.

À Globo Aves, especialmente ao Guera, pela doação das aves e pela amizade.

À Estelinha, por ter me ensinado tudo que sei quanto à manipulação de cultivos celulares.

Ao Dr. Rogério A. Conceição, pelo auxílio nos ensaios de adesão e pela amizade.

Ao Dr. Gerson Nakazato por toda ajuda com os experimentos celulares e pela amizade.

Ao Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto pela ajuda com o protocolo de Lambda Red e pela amizade.

À Dra. Janaina L. Leite Garbim por me co-orientar, me auxiliar em tudo que necessitei para desenvolver este trabalho, me oferecer sua amizade incondicional e tanto me ensinar.

À Ms. Livia Pilatti, por ser simplesmente a pessoa mais completa que já trabalhei na vida, dividiu em seus ombros (e assim aliviou os meus), o peso deste trabalho, me ofereceu sua parceria maravilhosa, sua amizade e seu carinho. Muito obrigada!

Aos meus colegas do Laboratório: MS. Telma Piacesi, Dra. Cristiane Mobilon, Dra. Thaís C. G. Rojas, Dr. Renato Maluta, Dr. Murilo I. Bution, Ms. Flávio Silveira, Eddy Patricia Lopes, MS. Renu Verma e Renato Félix, pela cumplicidade e amizade.

À Dra. Monique Ribeiro Tiba Casas por se tornar uma das melhores amigas que tenho.

À Dra. Fernanda de Pace, pela amizade e pelo legado que me deixou.

À Isildinha Colli, por me adotar como uma de suas filhas.

Por fim, agradeço à Bianca Zupirolli e ao Dr. Ricardo Destefano, por iluminar e alegrar a minha vida.

Resumo

Escherichia coli patogênica para aves (APEC) é responsável por inúmeras perdas no setor avícola mundial, por causar uma série de doenças nas aves que se apresentam de forma sistêmica ou localizada as quais são, coletivamente, denominadas colibacilose. Os mecanismos de virulência destas linhagens patogênicas para aves e, possivelmente, patogênicas para seres humanos ainda não foram totalmente elucidados. Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de estudar genes possivelmente envolvidos com a patogenicidade de uma linhagem APEC causadora de Síndrome da Cabeça Inchada (SCI-07) ONT:H31, a partir de resultados obtidos em um microarranjo realizado *in vitro*, o qual comparou a linhagem em estudo à linhagem padrão *E. coli* EHEC 8624 (linhagem enterohemorrágica). Nove genes, detectados como sendo super-expressos no microarranjo, nas condições estudadas, foram selecionados para construção de mutantes nulos e de seus complementos [*feoA* (transporte de ferro), *nirC* (transportador de nitrito), *flgE* (gancho flagelar), *tyrR* (regulador de transcrição da síntese de aminoácidos aromáticos), *potF* (subunidade periplasmática do transportador putrescina), *yehD* (possível fimbria), *bfr* (bacterioferrina), *csgA* (subunidade principal da curlina) e *entD* (enteroquelina)]. Os mutantes construídos foram avaliados quanto as suas capacidades de adesão e invasão em cultivos celulares, e quanto ao seu potencial patogênico em aves de um dia de idade em comparação à cepa selvagem. As linhagens Δbfr , $\Delta csgA$ e $\Delta nirC$ apresentaram diminuição da capacidade de adesão em fibroblastos de aves (linhagem FEG) em comparação à linhagem selvagem em ambos os modelos adotados: na presença e ausência de alpha-D-mannopyranoside; a linhagem $\Delta potF$ apresentou diminuição da adesão apenas na ausência de alpha-D-mannopyranoside. Os mutantes $\Delta csgA$ e $\Delta tyrR$ apresentaram redução na capacidade de invadir linhagem de células de trato respiratório humano (linhagem Hep-2). Nenhum mutante avaliado mostrou alteração na capacidade de invadir fibroblastos de aves (linhagem CEC-32). Os mutantes $\Delta flgE$ e $\Delta tyrR$ mostraram diminuição na capacidade de invadir e sobreviver em macrófagos de aves (linhagem HD11). A motilidade das linhagens mutantes $\Delta csgA$, Δbfr , $\Delta yehD$, $\Delta potF$, $\Delta entD$, $\Delta nirC$ e $\Delta feoA$ foi aumentada enquanto o mutante $\Delta tyrR$ mostrou redução de motilidade e o mutante $\Delta flgE$ tornou-se imóvel. Nenhuma linhagem mutante obtida mostrou a mesma capacidade da linhagem selvagem em causar mortalidade em aves de um dia; $\Delta feoA$ tornou-se hipervirulenta e todos os demais mutantes apresentaram atenuação em diferentes graus, sendo a linhagem $\Delta entD$ totalmente atenuada e, portanto, promissora quanto ao seu uso como linhagem

vacinal para o combate à colibacilose em aves, ou como linhagem carreadoras de epítomos presentes em outras linhagens APEC.

Palavras-chave: *Escherichia coli* patogênica aviária, colibacilose, *Escherichia coli*-patogenicidade, deleção de genes, ave.

Abstract

Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is responsible for significant economic losses in the poultry industry worldwide, by causing a range of systemic or localized diseases in poultry collectively termed colibacillosis. The virulence mechanisms of these pathogenic strains for poultry and possibly pathogenic for humans have not been fully elucidated. This work was developed in order to study genes potentially involved in the pathogenicity of an APEC strain isolated from a Swollen Head Syndrome case (SCI- 07) ONT:H31; since the results obtained in a microarray performed *in vitro*, which compared the SCI-07 strain to the standard strain *E. coli* 8624 EHEC (enterohemorrhagic strain). Nine overexpressed genes in microarray under the conditions studied were selected for construction of null mutants and their complements [*feoA* (iron transport), *nirC* (nitrite transporter), *flgE* (flagellar hook), *tyrR* (transcriptional regulator of the aromatic amino acids biosynthesis), *potF* (periplasmic putrescine transporter subunit), *yehD* (putative adhesin), *bfr* (bacterioferritin), *csgA* (major curling subunit) and *entD* (enterochelin)]. The mutants constructed were evaluated for their capacity for adhesion and invasion in cell cultures, and for its pathogenic potential in one-day-old chickens in comparison to the wild type strain (WT). The Δbfr , $\Delta csgA$ and $\Delta nirC$ strains showed decreased adhesion capacity on avian fibroblasts (CEF cells) compared to the WT in both models adopted: in the presence and absence of alpha-D-mannopyranoside, the $\Delta potF$ strain showed decrease on adhesion only in the absence of alpha-D-mannopyranoside. The $\Delta csgA$ and $\Delta tyrR$ mutants had reduced ability to invade human larynx cell line (Hep-2 cells). No mutant showed changes in the capacity of invade avian fibroblasts birds (CEC-32 cells). The $\Delta flgE$ and $\Delta tyrR$ mutants showed decreased ability to invade and survive into avian macrophages (HD11 cells). The motility of mutant strains $\Delta csgA$, Δbfr , $\Delta yehD$, $\Delta potF$, $\Delta entD$, $\Delta nirC$ and $\Delta feoA$ was increased while the $\Delta tyrR$ mutant showed reduced motility and the mutant $\Delta flgE$ became nonmotile. No mutant strain showed the same capacity of the WT in cause mortality in one-day-old chickens; $\Delta feoA$ became hypervirulent and all other mutants showed attenuation in different degrees, including the $\Delta entD$ that was completely attenuated and a promising vaccine candidate strain to combat colibacillosis in poultry, or as a carrier strain of epitopes present in other APEC strains.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli*, colibacillosis, *Escherichia coli*- pathogenicity, gene deletion, bird.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Genes super-expressos no microarranjo e escolhidos para deleção.....	42
Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes alvo de deleção no genoma da linhagem SCI -07.....	50
Tabela 3. Sequência dos iniciadores utilizados na construção dos complementos dos mutantes na linhagem SCI- 07.....	51
Tabela 4. Sequência dos iniciadores utilizados para deleção dos genes no genoma da linhagem SCI-07.....	52
Tabela 5. Sequência dos iniciadores utilizados para PCR em tempo real.....	55
Tabela 6. Quadro resumo das alterações verificadas nas análises <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos nove mutantes da linhagem SCI-07 construídos neste trabalho.....	92

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa do Plasmídio pKD46.....	44
Figura 2. Porção do plasmidio pKD3, o qual atua como molde para amplificação do cassete de resistência ao cloranfenicol.....	44
Figura 3. Quadro representativo da técnica de deleção por Lambda Red.....	46
Figura 4. Mapa do vetor de clonagem pACYC177.....	49
Figura 5. Eletroforograma em gel de agarose (0,8%) demonstrando a presença do plasmidio pKD46 na linhagem SCI0-07.....	59
Figura 6. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>nirC</i>	60
Figura 7. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>tyrR</i>	61
Figura 8. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>csgA</i>	62
Figura 9. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>potF</i>	63
Figura 10. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>yehD</i>	64
Figura 11. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>bfr</i>	65
Figura 12. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>flgE</i>	66
Figura 13. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>feoA</i>	67
Figura 14. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene <i>entD</i>	67
Figura 15. Motilidade do tipo <i>Swimming</i>	69
Figura 16. Quantificação da adesão à linhagem celular Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG).....	70
Figura 17. Ensaio de invasão das linhagens mutantes em comparação à selvagem em CEC32...71	71
Figura 18. Ensaio de invasão das linhagens mutantes em comparação à selvagem em Hep-2.....72	72
Figura 19. Sobrevivência em macrófagos (linhagem HD11).....	73
Figura 20. Mortalidade cumulativa em dias pós-infecção (dpi) de aves infectadas pela via do saco aéreo torácico direito.....	75
Figura 21. Análise da expressão gênica de genes relacionados à sobrevivência das linhagens SCI-07 e $\Delta nirC$	76
Figura 22. Curva de crescimento comparando a linhagem atenuada SCI-07 ao mutante atenuado $\Delta entD$	77

Sumário

1. Introdução.....	23
2. Revisão de Literatura.....	25
2.1. <i>E. coli</i> Patogênicas para aves e a colibacilose.....	25
2.2 APEC e o possível potencial zoonótico.....	28
2.3. Virulência de APECs.....	29
3. Justificativa	37
4. Objetivos.....	39
5. Material e Métodos.....	41
5.1. Linhagem bacteriana	41
5.2. Microarranjo.....	41
5.3. Sequenciamento.....	42
5.4. Confirmação da presença no genoma dos genes a serem deletados.....	43
5.5. Deleção gênica mediante utilização da técnica de "Lambda Red"	43
5.6. Construção dos complementos dos mutantes.....	48
5.7. Ensaio de adesão a Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG)	53
5.8. Ensaio de Invasão em células CEC32 e Hep-2 cultivadas <i>in vitro</i>	53
5.9. Ensaio de Sobrevivência em Macrófago.....	54
5.10. Quantificação da transcrição através de qRT-PCR.....	54
5.11. Curva de Crescimento	56
5.12. Ensaio de motilidade do tipo “swimming”.....	56
5.13. Ensaio de Formação de Biofilme	56
5.14. Ensaio <i>in vivo</i>	57
6. Resultados.....	59
6.1. Construção dos mutantes pela técnica de “Lambda Red”	59
6.2. Avaliação da motilidade do tipo “Swimming” e formação de biofilme.....	68
6.3. Adesão em células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG).....	69
6.4. Invasão em células CEC-32.....	71
6.5. Invasão em células Hep-2.....	71

6.6. Ensaio de sobrevivência em macrófagos de ave.....	72
6.7. Avaliação da mortalidade em aves.....	74
6.8. Relação do gene <i>nirC</i> com a sobrevivência intra-macrofágica.....	76
6.9. Curva de crescimento do mutante atenuado.....	77
7. Discussão.....	79
8. Conclusões.....	97
REFERÊNCIAS.....	99

1. Introdução

A carne de frango e ovos são fontes protéicas de alto valor nutricional, baixo custo e importantes geradores de empregos e divisas. O Brasil é o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo, mantendo-se nesta posição há dez anos. A carne de frango produzida no Brasil, atualmente, é exportada para mais de 150 países e o setor avícola responde por 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB), empregando direta ou indiretamente, 4,5 milhões de pessoas (Ubabef, 2013). A evolução da genética e das técnicas de manejo das aves comerciais permitiu que a produção avícola moderna se tornasse altamente eficiente e rentável. O sistema de criação em alta densidade proporciona ao produtor a maximização das instalações, com maior rendimento em termos de quilos de aves por metro quadrado. Com o crescimento da avicultura industrial, muitos patógenos ganharam importância, pois a aglomeração de animais favorece a multiplicação e a disseminação de agentes infecciosos dentro das instalações avícolas.

Linhagens de *Escherichia coli* patogênicas para aves são denominadas APEC (“Avian Pathogenic *Escherichia coli*”) (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Estas linhagens podem atuar como agentes primários ou secundários de infecção, podendo causar infecções localizadas ou sistêmicas extra-intestinais em aves de praticamente qualquer idade. No entanto, acredita-se que, em aves, *E. coli* infecte principalmente o trato respiratório, podendo tornar-se uma doença sistêmica quando há fatores predisponentes, como infecção viral e/ou bacteriana, alterações ambientais, deficiências nutricionais, imunossupressão ou quando se trata de linhagens APEC altamente patogênicas (Dho & Lafont, 1982; Gonzáles *et al.*, 1990; Nakamura *et al.*, 1992). A infecção das aves pode ocorrer ainda, via casca do ovo, umbigo do pinto recém-nascido, trato digestório ou via ascendente pela cloaca. A via aérea é, no entanto, a principal via de infecção em condições naturais (Silva, 1986). Diferentes patologias como a colisepticemia, coligranuloma (doença de Hajarre), doença respiratória crônica (DRC), celulite aviária, síndrome da cabeça inchada (SCI), peritonite, salpingite, osteomielite, sinovite, panoftalmia e onfalite estão associadas às *E. coli* aviárias (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother 1999).

Os genes de virulência em APEC estão localizados no cromossomo ou em plasmídios, e as amostras de *E. coli* são, ainda, hábeis a tornarem-se patogênicas pela aquisição horizontal de fatores de virulência (Vidotto *et al.*;1990). Segundo Dho-Moulin & Fairbrother (1999), os principais fatores de virulência são: antígenos de superfície O (lipopolissacarídeo somático), K

(polissacarídeo capsular) e H (proteína flagelar); resistência a antibióticos; capacidade de motilidade; adesinas; colicinas; siderofóros, em especial a aerobactina; resistência ao soro; produção de hemolisina; produção de toxinas e produção da hemaglutinina sensível à temperatura (Tsh).

Apesar de inúmeros trabalhos epidemiológicos terem sido realizados com o objetivo de se verificar qual gene, ou grupos gênicos, estão presentes nas diferentes linhagens APEC, ainda não se estabeleceram genes de patogenicidade específicos para estas linhagens. Além disso, a maioria dos estudos para entendimento da patogenicidade lida apenas com genes de virulência e se esquecem de que os mecanismos de reconhecimento de tecidos e células do hospedeiro (adesão, invasão), bem como os necessários para a sobrevivência da bactéria no interior do hospedeiro, tais como utilização de substratos disponíveis e aceptores de elétrons para respiração anaeróbia também são essenciais para este tipo bacteriano expressar sua virulência.

A linhagem estudada, neste trabalho, é denominada SCI-07 e foi isolada de uma ave de postura comercial de ovos de mesa, apresentando sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada. Esta linhagem foi tipificada pelo Instituto Adolfo Lutz (Dra. Kinue Irino) como possuindo antígeno somático O não tipável, como a maioria das linhagens causadoras de SCI isoladas no Brasil (Fantinatti *et al.*, 1994; Campos *et al.*, 2008) e antígeno flagelar H31 (ONT:H31).

Para este trabalho, partimos de um microarranjo realizado *in vitro*, selecionamos nove genes os quais mostraram expressão aumentada em comparação à expressão gênica da linhagem utilizada como padrão deste tipo de ensaio e construímos mutantes sítio-dirigidos para os genes: *feoA* (transporte de ferro), *bfr* (bacterioferrina), *yehD*, (possível fímbria), *tyrR* (regulador transcricional de aminoácidos aromáticos), *flgE* (porção do gancho flagelar), *potF* (transporte de putrecina), *csgA* (curlina), *entD* (enteroquelina) e *nirC* (transporte de nitrito). Os nove mutantes foram avaliados quanto seu potencial patogênico em cultivos celulares *in vitro* e em aves de um dia de vida.

2. Revisão de Literatura

2.1. *E. coli* patogênicas para aves e a colibacilose

Denomina-se colibacilose um amplo conjunto de doenças extra-intestinais, em aves comerciais ou silvestres, causadas por *E. coli*. A colibacilose abrange doenças localizadas ou sistêmicas, incluindo: colisepticemia, coligranuloma ou Doença de Hajarre, doença do saco aéreo também conhecida como Doença Respiratória Crônica (CRD), celulite, peritonite, salpingite, osteomielite/sinovite, panoftalmia, onfalite/infecção do saco da gema e Síndrome da Cabeça Inchada (SCI) (Barnes & Gross, 1997). A colibacilose é considerada tipicamente secundária, ocorrendo quando a resposta imune ou as barreiras naturais do hospedeiro estão injuriadas, embora existam linhagens altamente patogênicas capazes de desencadear quadro clínico e mortalidade atuando como agentes infecciosos primários. Coletivamente, as infecções causadas por APEC são responsáveis por perdas econômicas significativas para a indústria avícola. Por exemplo, quase metade das carcaças condenadas em abatedouros apresentam lesões condizentes com colisepticemia (Yogarathnam, 1995).

A distribuição dos vários sorotipos de *E. coli* é cosmopolita, habitando o trato entérico de mamíferos e de aves saudáveis, onde é encontrada em uma concentração maior que 10^6 bactérias por grama de fezes. Este número tende a ser maior em aves jovens onde, ainda, não se estabeleceu a microbiota (Barnes & Lozano, 1994). Entre aves saudáveis, 10 a 15% dos coliformes intestinais, compreendem sorotipos considerados altamente patogênicos, e as linhagens intestinais normais de uma ave não são as mesmas que desencadeiam, por exemplo, um quadro de pericardite nesta mesma ave (Barnes & Gross, 1997). A doença clínica é, frequentemente, relatada em frangos, galinhas, perus e patos. Na cama das aves e na poeira dos galpões avícolas podem ser isoladas de 10^5 a 10^6 *E. coli* por grama, sendo esta bactéria, ainda, hábil, a persistir no ambiente por longos períodos de tempo, bem como na ração, na água e nas fezes de roedores (Gross, 1994).

Aves normais e saudáveis, com defesas imunológicas intactas, são resistentes às infecções naturais por *E. coli*. Infecções ocorrem quando há fatores predisponentes como: pele ou mucosas comprometidas, sistema de fagócitos mononucleares alterados, seja por infecções virais (ainda que vacinais), parasíticas, bacterianas ou perda de microbiota natural; imunossupressão por

infecções virais, toxinas ou deficiências nutricionais; quando há exposição a agentes irritantes como amônia e poeira, os quais provocam deciliação no trato respiratório superior ou, ainda, quando as aves são submetidas a estresse severo (Gross, 1994).

A mortalidade embrionária, ou de aves jovens, é uma das manifestações mais comuns da colibacilose. A transmissão de APEC intra-ovo é muito comum, estando associada ao ambiente de incubação, o qual é muito propício à rápida dispersão de patógenos durante a incubação e a eclosão dos ovos, acarretando alta mortalidade dos pintainhos (Barnes, 1994). A fonte de contaminação mais importante para os ovos é o material fecal da superfície da casca do ovo que, em seguida, é penetrado levando à contaminação das membranas internas e do saco da gema onde a bactéria desenvolve-se, tornando-se foco de infecção. No entanto, infecções ovarianas e salpingite também têm sido descritas como fonte de contaminação por APEC. Aves com infecção do saco da gema, frequentemente, apresentam infecção do umbigo ou onfalite, a partir dos primeiros dias de vida e, como consequência, podem apresentar pericardite, indicando que houve dispersão da bactéria. Na maioria das vezes, se a ave não morre pela infecção da gema, observa-se apenas a retenção tardia desta e redução por tempo indeterminado no ganho de peso da ave sobrevivente (Barnes & Gross, 1997).

As infecções do trato respiratório por APEC estão principalmente associadas aos vírus da Doença de Newcastle e da Bronquite Infecciosa das Galinhas (ainda que cepas vacinais) e à bactéria *Mycoplasma*. O trato respiratório, ainda que minimamente danificado, é altamente susceptível à invasão e colonização por APEC (Barnes, 1994). A doença resultante desse quadro pode ser desde a aerossaculite, até septicemia e morte. A aerossaculite pode se espalhar por tecidos adjacentes causando pneumonia, pleuro-pneumonia, pericardite, perihepatite e septicemia. Menos comumente, pode haver a partir da infecção respiratória, salpingite, panoftalmia, infecções ósseas e sinoviais, como resultado da sepse. Infecções do saco aéreo são muito comuns em aves de corte de 4 a 9 semanas de vida, acarretando perdas econômicas relacionadas à morbidade, mortalidade e condenação de carcaça (Gross, 1994).

A salpingite em aves de postura ou reprodutoras ocorre quando o saco aéreo abdominal esquerdo é infectado por APEC, com a salpingite crônica podendo se desenvolver a partir desta infecção. Aves infectadas, frequentemente, morrem nos primeiros meses e as sobreviventes raramente põem ovos. A salpingite pode ocorrer, ainda, por via ascendente pela cloaca de

poedeiras e este quadro parece estar associado à alta atividade estrogênica no oviduto (Gross, 1994).

A infecção da cavidade peritoneal (peritonite), por APEC, ocorre em poedeiras, sendo caracterizada por derramamento de gema na cavidade abdominal e mortalidade aguda. A infecção ocorre quando a bactéria ascende através do oviduto e cresce rapidamente na gema depositada na cavidade peritoneal (Barnes & Lozano, 1994).

A septicemia aguda tem sido relatada, frequentemente, em perus. Neste tipo de septicemia, as aves afetadas apresentam-se em bom estado físico ao apresentarem o quadro, o que caracteriza sua natureza aguda. De maneira diferente da septicemia por APEC associada à infecção respiratória, neste caso não há tendência a desenvolver pericardite ou perihepatite. O fígado esverdeado, a marcada esplenomegalia e a musculatura congesta são característicos da septicemia aguda. O Coligranuloma ou Doença de Hajarre, muito importante em perus, é caracterizado por lesões serosas que lembram tumores, no fígado, ceco, duodeno e mesentério (Barnes & Lozano, 1994; Barnes & Gross, 1997).

A celulite aviária é um processo inflamatório, infeccioso e crônico na pele das aves, afetando abdômen, dorso e coxas de frangos de corte. Caracteriza-se por lesões que se apresentam como dobras caseosas, sendo uma das mais importantes causas de condenação de carcaça nos abatedouros avícolas. Os sorotipos de APEC O2, O78 e O não tipáveis (NT), produtores de aerobactina e colicina são os mais frequentemente isolados destas lesões. A superpopulação resultante do adensamento associado à pobre qualidade da cama das aves são os principais fatores predisponentes da celulite aviária (Barnes & Lozano, 1994; Barnes & Gross, 1997). Além disso, uma celulite suave localizada na pele da região do umbigo é resultante muitas vezes do quadro de onfalite. Recentemente, Quel *et al* (2013) verificaram a importância do fator vacuolizante de *E. coli* (ECVF), uma citotoxina termo-sensível vacuolizante, na indução do processo inflamatório da celulite por APEC.

A Síndrome da Cabeça Inchada é uma enfermidade de caráter inicial subcutâneo que acarreta um quadro respiratório, com edema facial e submandibular e posterior presença de sinais neurológicos (Barnes & Gross, 1997). Apresenta-se de forma aguda ou subaguda, tendo sido descrita, pela primeira vez, na África do Sul, em aves que apresentavam um quadro associado de

E. coli e coronavírus (Morley & Thomson, 1984). A doença tem sido identificada em áreas de intensa produção avícola no mundo todo (Nakamura *et al.*, 1997; Georgiades *et al.*, 2001). Em aves poedeiras e reprodutoras, acarreta queda na produção e na qualidade dos ovos causando mortalidade em torno de 1% a 3% e morte embrionária de 3% a 10% (Gross, 1991; Drowal & Woolcock, 1994). Em frangos de corte, onde são observados secreção nasal, depressão e edema subcutâneo, a taxa de mortalidade fica em torno de 1 a 5% podendo alcançar 30% em casos severos (Gaudry, 1991). A patogênese da SCI ainda não está bem elucidada. Sabe-se que o tecido linfóide associado à conjuntiva, quando da inflamação por infecção viral ou irritação por amônia, permite o acesso da APEC ao tecido subcutâneo (Morley & Thomson, 1994; Barnes & Gross, 1997).

A prevenção da colibacilose deve ser realizada mediante medidas de boas práticas sanitárias tais como, redução da exposição a vírus, controle de roedores e qualidade da água integrada a técnicas adequadas de manejo como ventilação adequada, utilização de ração peletada e tratamento da cama, que visam reduzir a carga microbiana nestes ambientes. A utilização de vacinas vivas ou inativadas contra sorotipos O78:K80 e O2:K1 nos plantéis avícolas tem-se mostrado eficiente garantindo razoável proteção experimental contra antígenos homólogos e pouca proteção contra heterólogos (Melamed *et al.*, 1991; Frommer *et al.*, 1994; La Ragione *et al.*, 2013). No entanto, vacinas vivas, as quais são sabidamente mais eficientes preparadas com linhagens não patogênicas, naturalmente isoladas ou atenuadas por deleção gênica, para utilização a campo, garantindo proteção contra linhagens APEC endêmicas em áreas de intensa produção avícola, ainda são escassas no mercado.

2.2. APEC e o possível potencial zoonótico

Alguns estudos têm mostrado correlação genômica positiva entre APEC e ExPEC (“Extraintestinal pathogenic *E. coli*”) de origem humana, especialmente *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* causadora de meningite em recém-nascidos (NMEC), o que sugere que algumas linhagens de APEC podem ser consideradas agentes com potencial zoonótico (Ewers *et al.*, 2007, Moulin-Schouleur *et al.*, 2007, Johnson *et al.*, 2008).

A presença comum de genes associados à virulência entre linhagens de APEC e UPEC, bem como o modelo da doença e a relação filogenética entre as linhagens são indicativos de uma

relação genética entre APEC e UPEC (Kaper *et al.*, 2004). Existe pouca informação na literatura sobre a comparação da expressão de genes específicos entre UPEC e APEC, isoladas de casos de clínicos. Alguns sorogrupos, também encontrados em APEC, já foram implicados em infecções urinárias sugerindo possível transferência de linhagens de aves para humanos e vice-versa (Burman *et al.*, 2003). Estudos de prevalência mostraram que APEC E058 e UPEC U17 compartilharam 20 dos 37 genes examinados, enquanto UPEC U17 e EHEC 933 compartilharam 6 em 37 e UPEC U17 e *E. coli* K12 apenas 5 em 37 (Zhao *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que UPEC são mais similares às APEC que as EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) ou que a *E. coli* K12. Recentemente, demonstrou-se, ainda que experimentalmente, o potencial de linhagens UPEC em causar doença em aves (Zhao *et al.*, 2009).

Além da sobreposição de genes cromossômicos, linhagens APEC e UPEC mostram substancial sobreposição em termos de sorogrupos e quanto à presença de certos genes associados com grandes plasmídios, os quais são comuns e característicos de APEC. Genes plasmídios que codificam para ColV (colicina), sistema de captação de ferro e resistência ao soro, os quais são conhecidos por sua frequência e localização exclusiva em grandes plasmídios transmissíveis como o é caso do plasmídio pTJ100 de APEC, contém muitos dos genes associados à virulência deste tipo bacteriano. Plasmídios encontrados em APEC têm mostrado forte similaridade de conteúdo genético com plasmídios presentes em UPEC (Johnson *et al.*, 2002).

Por fim, muitos genes de *E.coli* relacionados à aquisição de ferro são super expressos durante infecções do trato urinário de humanos (ITUs) da mesma forma que durante a infecção das aves, revelando que a aquisição de ferro é crítica para *E. coli* sobreviver tanto no sangue quanto no trato urinário. Este é mais um fato que evidencia o potencial de uma APEC em atuar como uma UPEC ou como um reservatório de genes de virulência para esta (Zhao *et al.*, 2009).

2.3. Virulência de APECs

Um grande número de fatores de virulência tem sido identificado em linhagens APEC isoladas de aves apresentando colibacilose. Até o momento, nenhum fator isolado, reconhecidamente responsável pela virulência e que permita distinguir todas as linhagens patogênicas das não patogênicas foi identificado. Linhagens patogênicas ou não, podem

permanecer no trato entérico das aves pelos mesmos períodos de tempo e são similares quanto às características bioquímicas e de sensibilidade a drogas.

2.3.1. Fatores de virulência descritos em APEC

Dentre eles destacam-se:

O antígeno O ou antígeno somático é uma endotoxina liberada pela lise das células bacterianas lisas. É composto por complexo polissacarídeo-fosfolípido ligado a uma porção protéica resistente à fervura. Os sorotipos mais identificados causando doença nas aves são O1, O2, O8, O18, O35, O78, O88, O109, O115 e O não tipáveis (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Silveira *et al.*, 2002). Sendo que os sorotipos O1, O2 e O78 são os mais frequentemente isolados em casos de colibacilose ao redor do mundo, representando de 15 a 61% do total de isolados (Dozois *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 1998) e sorotipos O não tipáveis (NT) ou rugosos, mais frequentemente isolados por nosso grupo de trabalho em amostras de APEC nacionais de casos de onfalite e septicemia (Silveira *et al.*, 2002).

O antígeno K, ou capsular, é um polímero de ácidos com 2% de açúcar. Os antígenos capsulares K1 e K80 estão relacionados à capacidade das APEC em resistir à destruição pelos heterófilos e pelo soro normal da ave (Rosenberger *et al.*, 1985). Linhagens patogênicas de *E. coli*, com mutação em genes do “operon” codificador da cápsula mostraram-se muito menos letais para aves com um dia de idade que as linhagens não mutagenizadas (Czirok *et al.*, 1990; Pourbakhsh *et al.* 1997).

E. coli produz adesinas fimbriais (tipo 1, P e curli), que a torna capaz de se fixar a vários tecidos do hospedeiro, iniciando, facilitando, ou mantendo o processo de colonização (Wooley *et al.* 1998). As fimbrias do tipo 1 são estruturas amplamente difundidas entre as enterobactérias. Em linhagens patogênicas de *E. coli*, sua principal propriedade adesiva é a colonização das células epiteliais do trato respiratório superior. Fimbrias do tipo 1 são bloqueadas por anti-soros específicos e pelo carboidrato D-manose, que competem pelo mesmo receptor celular usado por ela (Moon, 1990; Mol & Oudega, 1996). As Fimbrias do tipo 1 são proteínas codificadas pelo operon *fim*, o qual está localizado no cromossomo bacteriano (Orndorff, 1994). O gene *fimA* apesar de não estar diretamente relacionado às propriedades adesivas da fimbria, constitui a porção antigênica dela. Acredita-se que o alto polimorfismo genético característico de *fimA* possa

ser resultado da diversidade gerada pela necessidade de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (Peek *et al.*, 2001).

Além da fimbria tipo 1, algumas linhagens de *E. coli* isoladas de aves possuem o operon da fimbria P, a qual é geralmente expressa em pequenas quantidades e detectada através de ensaios de micro-hemaglutinação D-manose resistente e imunofluorescência (Vidotto *et al.*, 1997). A adesina fimbrial P foi, inicialmente, descrita em linhagens de *E. coli* relacionadas às infecções do trato urinário superior humano (Mol & Oudega, 1996). A fimbria P é codificada pelo “operon” *pap*, o qual compreende 11 genes localizados no cromossomo bacteriano (Kariyawasam *et al.*; 2006). Através de estudos “*in vivo*”, Pourbakhsh *et al.* (1997) verificaram que existe uma variação da expressão das adesinas fimbriais P de acordo com a sua localização no hospedeiro, e sugeriram que estas adesinas não são importantes apenas na colonização inicial do trato respiratório superior, mas apresentam importante papel nos estágios mais tardios da infecção.

Fímbrias “curli” são estruturas filamentosas, finas e encaracoladas. Estas fímbrias são encontradas na superfície de *E. coli* e *Salmonella* spp. e exercem sua função na ligação da bactéria à matriz extracelular e às proteínas séricas fibronectina e laminina (Collinson *et al.*, 1993). Essas fímbrias são expressas *in vitro* a 25°C, na fase estacionária de crescimento e em meios de cultura com baixa osmolaridade (Maurer *et al.*, 1998; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Os genes responsáveis pela expressão da fimbria “curli”, na superfície bacteriana, estão organizados em um “operon” denominado *csgAB*. As linhagens bacterianas que produzem a fimbria “curli” têm capacidade de se auto-agregar e de ligarem-se à fibronectina e à laminina. Isto pode constituir uma vantagem seletiva à bactéria, permitindo a colonização inicial do trato gastrointestinal (La Ragione & Woodward 2002).

Algumas amostras de *E. coli* apresentam a capacidade de sintetizar bacteriocinas, denominadas colicinas, as quais liberadas no ambiente diminuem a competição por outras bactérias do mesmo nicho (Williams & Warner, 1980). Colicinas são sintetizadas na forma de complexos de duas proteínas, onde a subunidade maior é responsável pela lesão nas células alvo e a subunidade menor tem a função de autoproteção. Nas células-alvo, colicinas ligam-se aos receptores da membrana externa utilizando o seu sistema de translocação para acessar o citoplasma onde exercem seus efeitos tóxicos, os quais incluem a despolarização da membrana

citoplasmática, atividade DNase, RNase ou inibição à síntese de mureína. Os plasmídios colicinogênicos (plasmídios pCol) possuem genes que são responsáveis pela produção de 20 diferentes colicinas. A produção de colicina V é mediada pelo plasmídio pColV o qual está associado à invasão e patogenicidade de *E. coli* (Johnson *et al.*, 2003). O plasmídio pColV pode, ainda, codificar proteínas da membrana externa que são responsáveis por resistência ao soro e sideróforos (Johnson *et al.*, 2002; 2006). As linhagens que produzem colicinas, geralmente, apresentam vantagem seletiva sobre as linhagens não produtoras na colonização do organismo hospedeiro. Linhagens APEC mutantes deficientes para o plasmídio pColV demonstraram diminuição na virulência, sugerindo que genes deste plasmídio estão envolvidos no estabelecimento da infecção na ave (Skyberg *et al.*, 2008).

E. coli sintetiza diversos compostos com a finalidade de obter ferro do organismo hospedeiro, como hemolisinas e sideróforos, que a permite crescer em tecidos com condições limitantes deste íon. A aerobactina, codificada por genes plasmidiais, atua como quelante de ferro (Sabri *et al.*, 2006). A enterobactina, por sua vez, é um quelante de ferro codificado por genes cromossômicos (Kariyawasam *et al.*, 2006). Silveira *et al.* (2002) verificaram que linhagens APEC patogênicas expressaram o sistema de absorção de ferro, enquanto que as linhagens não patogênicas não o expressaram. Recentemente, o “operon” *sitABCDE* (“*Salmonella enterica* homologue system”) foi identificado em uma linhagem de APEC (Sabri *et al.*, 2006; 2008). Nesta linhagem, o “operon” *sitABCDE* constitui um sistema transportador de ferro e manganês que, em combinação com outros sistemas de absorção de ferro, contribui para aquisição de íons e a sobrevivência da bactéria ao estresse oxidativo (Sabri *et al.*, 2006).

E. coli pode, ainda, produzir hemolisinas (Smith, 1963). Hemolisina é uma proteína com atividade citolítica que causa lise de eritrócitos. Devido à sua atividade hemolítica ocorre aumento da quantidade de íons Fe^{+2} livres que favorecem o crescimento bacteriano (Emery *et al.*, 1992). As hemolisinas mais prevalentes em APEC são hemolisina E e Tsh (Ewers *et al.*, 2003) mas as hemolisinas A e D as quais são comuns em UPEC, também já foram descritas em APEC (Kariyawasam *et al.*, 2007).

Poucos estudos demonstraram, até hoje, que linhagens de *E. coli* de origem aviária são capazes de produzir toxinas. Emery *et al.* (1992) demonstraram que 22,5% das bactérias isoladas de aves com septicemia produziam “heat-labile toxin” (LT) com atividade citotóxica para células

Vero. Fantinatti *et al.* (1994) observaram atividade citotóxica para células Vero em apenas 3 bactérias patogênicas, entre as 17 isoladas de aves com septicemia e Blanco *et al.* (1997) demonstraram que apenas 7% das amostras de *E. coli* isoladas de aves com septicemia eram toxigênicas, sugerindo que a capacidade patogênica, de linhagens isoladas de casos de septicemia, parece não estar relacionada à produção de toxinas. No entanto, em linhagens de *E. coli* isoladas de aves com quadro clínico de Síndrome da Cabeça Inchada, a produção de toxinas foi verificada em 72% das linhagens isoladas (Parreira & Yano, 1998). Parreira & Yano (1998) demonstraram, ainda nestas linhagens, a produção de uma citotoxina ativa em células Vero e HeLa, a qual foi denominada VT2y.

A “temperature sensitive hemagglutinin” (Tsh) é uma hemaglutinina expressa preferencialmente em baixas temperaturas (26-30°C) com atividade de hemaglutinação em eritrócitos de galinha (Dozois *et al.*, 2000; Kostakioti & Staphopoulos, 2004). O gene *tsh*, em muitas linhagens de *E. coli*, está localizado no plasmídio pCoIV. Contudo, o gene *tsh* também foi identificado em plasmídios de virulência e em Ilhas de Patogenicidade presentes em algumas linhagens patogênicas de enterobactérias (Dozois *et al.*, 2000). Campos *et al.* (2005) demonstraram a presença do gene *tsh* entre 25 e 50% dos isolados clínicos de *E. coli* de origem aviária, e em 6% das bactérias isoladas de aves saudáveis. Esta observação sugere uma relação entre a presença do gene *tsh* e a patogenicidade de APEC. Recentemente, nosso grupo demonstrou que APEC também pode induzir efeito enterotóxico em modelo de alça ligada em coelho, e que este efeito é mediado pelo Tsh (Maluta *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos têm demonstrado que mutações em genes específicos podem atenuar, ou abolir a patogenicidade, indicando participação destes genes na virulência destas linhagens APEC. Lamarche *et al.* (2005) demonstraram que a virulência da linhagem de APEC χ 7122 em aves foi atenuada pela inativação do sistema Pst (sistema de transporte de fosfato). O mutante *pst* causou menores lesões extra-intestinais e menor número de bactérias mutantes foram recuperadas de diferentes tecidos das aves infectadas em comparação à linhagem selvagem. A linhagem de APEC mutante para o gene *yjjQ* (codifica para uma proteína sem função definida: hipotética) tornou-se atenuada para aves infectadas no 5º dia de vida, colonizou pobremente todos os órgãos analisados e foi incapaz de persistir nas aves (Li *et al.*, 2008). Janakiraman & Slauch (2000) demonstraram que a mutação no gene *sitB* (sistema de transporte de ferro e manganês) de uma

linhagem APEC tornou-a atenuada para aves. Outras linhagens APEC Δsit apresentaram reduzida capacidade de colonização de fígado, baço e pulmão de aves infectadas experimentalmente em comparação à linhagem selvagem (Sabri *et al.*, 2008). Deleções no grupo de genes que codificam para aerobactina e salmochelina resultaram em linhagens de APEC avirulentas e incapazes de colonizar sítios extra-intestinais (Dozois *et al.*, 2003). Caza *et al.* (2008) demonstraram que os genes isolados *iroN* e *iroC* e, em conjunto *iroD/iroE*, todos relacionados à captação de ferro, são críticos para a virulência de APEC, uma vez que os mutantes para estes genes ou conjunto gênico tiveram sua patogenicidade reduzida em aves. Chen *et al.* (2008) mostraram que o mutante *tsh* (hemaglutinina sensível à temperatura) teve sua patogenicidade reduzida em aves e Kariyawasam & Nolan (2009) demonstraram atenuação de mutantes Pap (fimbria P) de APEC em comparação com a linhagem original.

Mais recentemente, elucidou-se a participação de genes relacionados ao Sistema de Secreção Tipo 6 (SST6) na patogenicidade de APEC. Neste caso, os mutantes para os genes *clpV*, *hcp* e *icmF* do SST6 da linhagem de APEC SEPT 362, causadora de septicemia em aves, mostraram redução da patogenicidade em modelos *in vitro* e *in vivo* (Pace *et al.*, 2010; Pace *et al.*, 2011)

2.3.2 Genes avaliados neste trabalho quanto sua participação na virulência de APEC

Nove genes superexpressos no ensaio de microarranjo foram escolhidos para serem individualmente deletados e terem seus perfis de patogenicidade *in vitro* e *in vivo* avaliados em comparação a uma linhagem APEC selvagem, causadora de Síndrome da Cabeça Inchada. Estes genes foram: *yehD*, *potF*, *csgA*, *flgE*, *tyrR*, *bfr*, *nirC*, *feoA* e *entD*.

O gene *yehD* codifica para uma possível adesina fimbrial para a qual ainda não há trabalhos descritos na literatura.

O gene *potF* codifica para uma proteína de membrana da família de transportadores de membrana ABC sendo responsável por importar putrescina para dentro da célula bacteriana. Putrescina é a poliamina mais importante em *E. coli* e atua como um importante fator de crescimento e como molécula de sinalização celular bacteriana (Van Dam *et al.*, 2002; Igarashi & Kashiwagi, 2006).

O gene *csgA* codifica para a maior subunidade da fimbria curli e tem sido aceita como importante característica de virulência de APEC, envolvida em garantir a sobrevivência da bactéria no ambiente e atuando no processo de colonização das aves por APEC (Olsen *et al.*, 1993).

O gene *flgE* codifica para a proteína do gancho flagelar. Estudos anteriores, nos quais foi realizada a deleção do gancho flagelar, demonstraram a abolição da motilidade das bactérias *E. coli* e *Salmonella* (Saito *et al.*, 1998; Bonifield *et al.*, 2000).

O gene *tyrR*, por sua vez, codifica para um regulador transcripcional que atua como indutor e repressor da transcrição de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos aromáticos. Acredita-se que o nível intracelular das várias formas da proteína TyrR seja crítico para os processos regulatórios (Pittard *et al.*, 2005), sendo, o seu papel ainda não estudado em APEC.

O gene *bfr* codifica para uma bacterioferritina ainda não caracterizada em APEC, a qual desempenha um papel fundamental na homeostase celular do ferro atuando tanto como uma proteína de armazenamento de ferro quanto de detoxificação deste íon (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999).

O gene *nirC* codifica para uma proteína que atua como um canal específico de transporte de nitrito para a célula bacteriana em *E. coli* e *Salmonella*. O nitrito tem papel crucial no metabolismo de nitrogênio, atuando como aceptor final de elétrons, e no processo de detoxificação citoplasmática, livrando a célula de altas concentrações de nitrito, o qual é tóxico por se converter espontaneamente em Óxido Nítrico (NO). Recentemente, Das *et al.* (2009) demonstraram que *nirC* é requerido para a patogenicidade em *Salmonella*, por atuar no desligamento da produção de NO por parte do macrófago hospedeiro em uma via dependente da Ilha de Patogenicidade 2.

Como apresentado anteriormente, a concentração do íon ferro nos tecidos dos animais é extremamente baixa e as bactérias, por sua vez, necessitam de ferro para suas reações metabólicas como um elemento crucial e para obtê-lo, desenvolveram inúmeras moléculas de alta afinidade para aquisição deste escasso íon. São descritos ao menos cinco sistemas de absorção e assimilação de ferro em APEC sendo que alguns deles já tiveram seu papel na patogenicidade

descritos (Caza *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012; Ling *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2013). Um destes sistemas consiste no operon *feo*, que realiza o transporte de Fe^{+2} . Este “operon” já foi previamente descrito em *E. coli*, como importante na aquisição de ferro em condições anaeróbias de crescimento (Kammler *et al.*, 1993). O gene *feoA* é o primeiro gene deste “operon”. *E. coli* extra-intestinais lançam mão de sideróforos, proteínas de altíssima afinidade por Fe^{+3} para o sequestro deste íon durante o processo de infecção. Enterobactinas, Yersiniabactinas e Salmoquelinas são sideróforos produzidos por APEC e, sabidamente, contribuem para a virulência destas bactérias (Dozois *et al.*, 2003). O gene *entD* codifica para 4’ fosfopanteteinil transferase (PPTase), a molécula precursora da síntese de enterobactina (Gehring *et al.*, 1997) e salmoquelina (Fischbach *et al.*, 2005).

3. Justificativa

Diante do apresentado e embasados em uma nova abordagem oriunda do aumento do conhecimento da genética molecular de subpatotipos (Maturana *et al.*, 2011), na importância das linhagens APEC para a avicultura comercial e no potencial zoonótico de linhagens derivadas de animais, construímos e estudamos alguns mutantes da linhagem APEC denominada SCI-07 isolada a campo de uma ave apresentando Síndrome da Cabeça Inchada, quanto ao potencial patogênico *in vivo* e *in vitro*. Consideramos que esta linhagem é representativa daquelas responsáveis por causar colibacilose em aves, e seria, portanto, útil para posterior utilização como linhagem vacinal além de nos fornecer maior conhecimento da virulência de APEC.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Verificar se os genes da linhagem SCI-07, com expressão aumentada em análise de microarranjo, são relacionados a características tais como: capacidade de adesão e invasão de linhagens celulares cultivadas *in vitro*; capacidade de sobrevivência em macrófagos e potencial patogênico em aves de um dia de idade.

4.2. Objetivos específicos

- Construção de mutantes nulos em genes específicos.
- Avaliar nos mutantes nulos características que incluam: capacidade de adesão e invasão de linhagens celulares cultivada *in vitro* e viabilidade intracelular em macrófagos.
- Analisar o potencial patogênico dos mutantes nulos em aves de um dia de idade através da comparação da mortalidade e grau de lesão do grupo de aves desafiado com cultura das linhagens mutantes em comparação à linhagem selvagem.

5. Material e Métodos

5.1. Linhagem bacteriana

A linhagem APEC SCI-07 (ONT:H31) foi isolada do seio infra-orbitário de uma ave de postura apresentando quadro clínico de síndrome da cabeça inchada. Esta linhagem pertence à coleção bacteriana do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana (LBMB), do Depto. Genética e Evolução do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Essa linhagem APEC apresenta resistência aos antibióticos Estreptomicina (100µg/ml), Gentamicina (50µg/ml) e Tetraciclina (50µg/ml) sendo capaz de causar aerossaculite, pericardite, septicemia e síndrome da cabeça inchada.

5.2. Microarranjo

Contamos com os dados do Microarranjo realizado em cooperação com o Laboratório da Dra. Vanessa Sperandio, Universidade do Texas, Dallas, USA. O “Affymetrix GeneChip *E. coli* Genome 2.0 array” foi utilizado para comparar a expressão gênica da linhagem SCI-07 ONT:H31 com a linhagem controle (padrão do “Affymetrix”) a EHEC 8624 (linhagem enterohemorrágica), este Microarranjo contou com 4 genomas de diferentes linhagens de *E. coli*, os quais foram utilizados como sondas, são eles: K-12 MG1655 (linhagem laboratorial), UPEC CFT073 (linhagem uropatogênica), EHEC EDL933 e EHEC Sakai O157:H7 (ambas linhagens enterohemorrágicas). A bactéria SCI-07 foi crescida em meio DMEM a 37°C em agitação (150rpm) até a D.O de 0,4. Assim sendo, o RNA total da cultura foi extraído com a utilização do “Qiagen RNeasy Protect Bacteria Kit”. Todo o processamento, marcação e hibridização do RNA previamente purificado foi realizado como descrito pelo manual “Affymetrix Gene Expression Technical Manual” (disponível em <http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expressionmanual.affx>). Os resultados foram analisados pelo programa de análise “Genechip Affimetrix”, sendo os dados obtidos comparados para a análise da expressão gênica, diminuída ou aumentada dos diversos genes sondados. Os dados relativos ao Microarranjo foram depositados na base de dados GEO do NCBI sob o numero de acesso 48015. A partir destes dados, agrupamos os genes com expressão aumentada em três grupos. Genes super-expressos, cuja expressão estava aumentada de 8,5 a 15 vezes; genes muito expressos (expressão aumentada de 4 a 8 vezes) e genes pouco expressos

(expressão estava aumentada de 0,5 a 3,5 vezes). Os genes eleitos para deleção bem com o grau de super-expressão estão dispostos na Tabela 01.

Tabela 1. Genes super-expressos no microarranjo e escolhidos para deleção.

Gene	Proteína codificada	Super-expressão
<i>yehD</i>	Possível adesina fimbrial	7,9
<i>flgE</i>	Gancho flagelar	6,8
<i>potF</i>	Transportador de putrescina da família ABC	7,0
<i>csgA</i>	Subunidade principal da curlina	6,8
<i>tyrR</i>	Regulador transcricional	10,9
<i>Bfr</i>	Bacterioferritina	9,5
<i>nirC</i>	Maior transportador de nitrito	3,2
<i>entD</i>	4'fosfopanteteinil transferase	12,7
<i>feoA</i>	Transportador A de íon ferro	4,0

5.3. Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento da linhagem de *Escherichia coli* SCI-07 utilizando-se a tecnologia 454 Life Sciences (Margulies *et al.*, 2005) para obtenção de sequências de aproximadamente 400 pares de base (pb). A montagem foi realizada com o programa GS De novo Assembler versão 2.5.3 com parâmetros padrão para genoma de bactéria. Os *contigs* resultantes foram ordenados através de alinhamento com o genoma de referência de *E. coli* APEC O1 (“Genbank Acession Number” CP000468.1) com auxílio do aplicativo Promer (KURTZ *et al.* 2004) versão 3.0 e mapeamento "um para um" da opção “show-tiling”. A cobertura dos reads foi calculada assumindo como referência um genoma 5Mbp, assim como o genoma de *Escherichia coli* APEC O1 (Johnson, *et al.* 2007). Este trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório de Genômica e Proteômica sob a coordenação do Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, financiado pela Fapesp (Processo nº 2008/567396) e pela Capes (Programa de PG-GBM, IB, UNICAMP). O genoma “draft” da SCI-07 está disponível na base de dados do NCBI sob o número de acesso CP000468.1 (Rojas *et al.*, 2012). Dados genômicos levaram à constatação de que a linhagem SCI-07 possui dois grandes plasmídios, os

quais por alinhamento mostraram-se muito similares aos plasmídios pAPEC-02-ColV e pColIb-P9. Os dados de sequenciamento foram utilizados para identificação gênica e para a construção dos iniciadores para deleção e complementação.

5.4. Confirmação da presença no genoma dos genes a serem deletados.

A confirmação da presença, no genoma da SCI-07, dos genes eleitos pela análise do Microarranjo para serem deletados foi realizada mediante a seguinte reação de PCR: 5 µL de Tampão 10X para PCR Fermentas; 15,6 µL de água ultra pura; 5 µL de DNTP mix (2mM cada); 0,4 µL Taq DNA polimerase; 2 µL de MgCl₂ (25mM); 0,5 µL de cada iniciador (10µM) (Tabela 2); 1,0 µL de DNA da linhagem SCI 07. O DNA foi extraído pelo Kit Wizard Genomic DNA Purification Promega, de acordo com as recomendações do fabricante. O termociclador foi programado com 1° estágio de 95°C/1min (1ciclo), 2° estágio de 95°C/20seg, 60°C/1min, 72°C/1min (25 ciclos) e 3° estágio de 72°C/5min (1 ciclo). Os amplicons foram submetidos ao gel de agarose a 1% sobre campo elétrico de 100V. O gel foi corado em solução de Brometo de Etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta.

5.5. Deleção gênica mediante utilização da técnica de “Lambda red”

5.5.1. Obtenção dos plasmídios

O plasmídio pKD46 (Figura 1) hospedado em *Escherichia coli* linhagem DH10β e o plasmídio pKD3 (Figura 2) hospedado em *Escherichia coli* linhagem S17λpir foram extraídos utilizando-se o Kit Qiagen Mini Prep Spin (Qiagen nº catalogo 27106). Culturas de DH10β pKD46 foram preparadas em 10mL de caldo LB contendo 100µg/mL de Ampicilina e incubados durante à noite a 29°C. A cultura total foi centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos, o sedimento obtido foi submetido ao Kit Quiagen mini prep de acordo com as recomendações do fabricante.

Para o plasmídio pKD3 a cultura de S17pKD3 foi preparada em 4mL de caldo LB acrescido de 20µg/mL de Cloranfenicol. A cultura foi incubada a 37°C durante à noite, posteriormente 1 mL da cultura foi centrifugado como descrito anteriormente e submetido ao Kit mini prep.

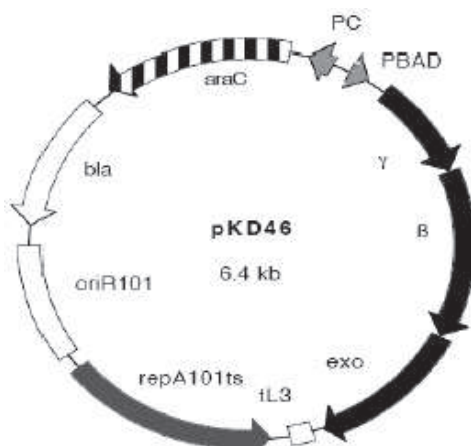


Figura 1. Mapa do Plasmídio pKD46 o qual carrega o sistema de recombinação denominado “Lambda red” representado pelas proteínas beta, gama e exo sob o controle do promotor de arabinose (pBAD) (Datsenko & Wanner, 2000).

A. Template plasmids

pKD3 (2804 bps)

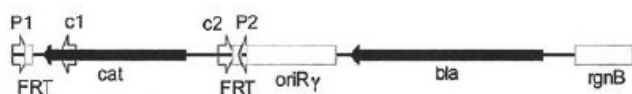


Figura 2. Porção do plasmidio pKD3 o qual atua como molde para amplificação do cassete de resistência ao cloranfenicol (cat), as regiões P1 e P2 referem-se às sequências as quais os iniciadores se anelam para a amplificação do inserto (Datsenko & Wanner, 2000).

5.5.2. Transformação da linhagem SCI-07 com o plasmidio pKD46.

Uma cultura de 4mL da linhagem SCI07 foi preparada em caldo LB contendo os antibióticos Tetraciclina (40 µg/mL), Estreptomicina (100 µg/mL) e Gentamicina (10 µg/mL) e incubada a 37°C durante à noite. Desta cultura, inoculou-se 1 mL em 100mL de caldo LB mantido à temperatura ambiente e procedendo-se à incubação a 29°C em agitação (150 rpm) até a obtenção da OD₆₀₀ 0,5 (2 horas e 30 min, aproximadamente). Esta cultura foi resfriada em gelo por 30min. A cultura foi, então, centrifugada a 4000rpm por 15min a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado três vezes em solução gelada de glicerol 10% (4000rpm por 15min a 4°C). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 100µL de água gelada, misturado a

15µL do plasmídeo pKD46 e depositado em cubeta de 0,2cm para eletroporação. A amostra foi submetida ao eletroporador Bio Rad calibrado com 2,5 Kv de voltagem, 200 Ohms de resistência e 25µFD de capacitância. Após o pulso elétrico, acrescentou-se, imediatamente, dentro da cubeta de eletroporação, 1,5 mL de caldo SOC e a bactéria foi, então, incubada a 29°C durante à noite. Decorrido este período, a cultura foi centrifugada a 12000g por 2min, o precipitado ressuspensionado em 100µL de PBS pH 7,4 e plaqueado em Agar LB contendo 100µg/mL de Ampicilina (LB Amp). As placas foram incubadas a 29°C por 24 horas.

5.5.3. Seleção dos transformantes

Colônias emergentes nas placas de Agar LB Amp foram inoculadas em caldo LB contendo os antibióticos Ampicilina (100 µg/mL), Tetraciclina (40 µg/mL) e Gentamicina (10 µg/mL), e as culturas foram incubadas a 29°C/24h. A presença do plasmídeo pKD46 foi confirmada através da extração de plasmídios e verificação em gel de agarose 0,8% após eletroforese. Colônias da linhagem SCI-07 positivas foram acrescidas de Glicerol (30% concentração final) e estocadas (-80°C).

5.5.4. Iniciadores

Os iniciadores utilizados para confirmação da presença dos genes a serem deletados no genoma da SCI-07, para verificação da deleção e para a construção dos complementos foram desenhadas pelo programa “OligoPerfect Designer Invitrogen” (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>) e suas sequências estão dispostas nas Tabelas 2 e 3.

Os iniciadores para deleção dos genes foram desenhados manualmente e submetidos ao programa “Oligo Primer Check” (disponível em <http://depts.washington.edu/bakerpg/primertemp/primermelttemp.html>), para a detecção de possíveis dímeros ou grampos que pudessem ocorrer intra ou entre as sequências. As seqüências destes oligos estão dispostas na Tabela 4. Estes iniciadores apresentam 70 pares de bases dos quais 50 pares são homólogos aos genes alvos da deleção e atuam na recombinação homóloga. Os 20 pares de base restantes são referentes ao cassete de cloranfenicol e estes, sim, atuam na reação de PCR.

Substituição Gênica por Transformação Linear

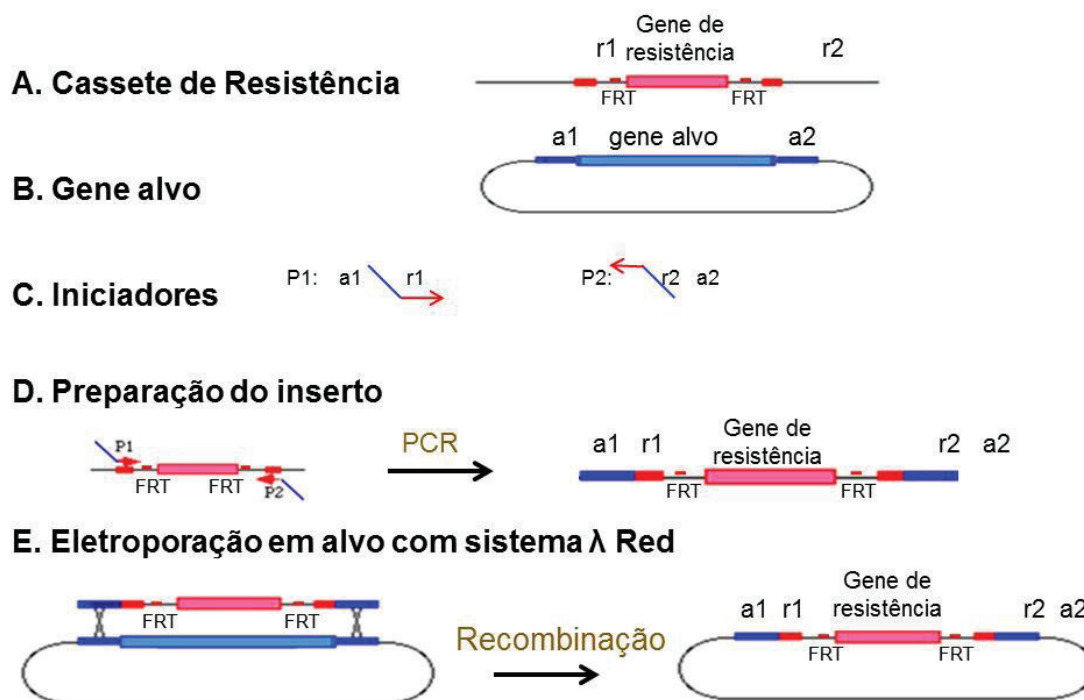


Figura 3. Quadro representativo da técnica de deleção por Lambda Red. (A) Representação do plasmídeo pKD3. (B) Representação do gene alvo de deleção no cromossomo da linhagem SCI-07 flanqueado pelas sequências de 50pb (a1 e a2) alvos da recombinação. (C) Representação dos oligonucleotídeos de 70 pares de bases que amplificaram o cassete de resistência ao cloranfenicol a partir do plasmídeo pKD3. Nesta representação a1 e a2 referem-se aos 50 pares de bases homólogos ao gene alvo da deleção (que não atuam na PCR, apenas na recombinação homóloga) e r1 e r2 aos iniciadores que amplificam o cassete de cloranfenicol (Datsenko & Wanner, 2000). (D) Representação da amplificação do inserto por PCR utilizando os iniciadores longos. (E) Evento de recombinação homóloga.

5.5.6. Construção do inserto

A reação de PCR para construção do inserto foi composta de 5 μ L de Tampão Pfx 10X; 38,1 μ L de água ultra pura; 1,5 μ L de DNTP mix (10mM cada); 0,4 μ L Platinum Pfx DNA polimerase; 1 μ L de $MgSO_4$ (50mM); 1,5 μ L de cada iniciador (10 μ M) e 1,0 μ L da solução de pKD3. Para cada gene, foram preparados 200 μ L totais de reação de PCR. O termociclador foi programado com 1º estágio de 94°C/5min (1ciclo), 2º estágio de 94°C/15seg, 55°C/30seg, 68°C/1min (30

ciclos) e 3º estágio de 68°C/10min (1 ciclo). Os amplicons foram submetidos ao gel de agarose a 1% sobre campo elétrico de 100V. O gel foi corado em solução de Brometo de Etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta.

5.5.7. Concentração do inserto

Após a confirmação do tamanho do inserto de 1,1Kb, os 200µL de produto da PCR foram precipitados utilizando-se a técnica do cloreto de sódio 5M (Sambrook *et al.*, 2001). Aos 200µL de produto de PCR foram acrescidos 8µL de cloreto de sódio 5M e 550µL de etanol absoluto gelado. Essa mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a -20°C por 25 min. Decorrido este período, a mistura foi centrifugada em micro-centrifuga (12.000rpm) por 10 min a 4°C. O DNA precipitado foi lavado três vezes em 1 mL de etanol 70% (12.000 rpm) em micro-centrifuga por 2 min a 4°C, o tubo contendo o sedimento permaneceu por 5 min. em estufa a 37°C para evaporação do etanol e o DNA ressuspendido em 10µL de água ultra pura.

5.5.8. Eletroporação do inserto

Uma cultura de SCI-07 carreando o plasmídio pKD46 foi preparada em caldo LB contendo 100µg de Ampicilina e incubada a 29°C durante à noite. Desta cultura, transferiram-se 500mL para 20mL de caldo LB fresco acrescido de 10µL de Ampicilina a 50mg/mL e 5mL de L-arabinose a 1M. A cultura foi incubada a 29°C em agitação (150rpm) até atingir a D.O. 0,5. Atingida a D.O. desejada, um volume adicional de 5mL de L-arabinose a 1M foi acrescido à cultura que permaneceu mais 30 min a 29°C em agitação (150 rpm). A cultura foi, então, centrifugada a 4000rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado três vezes em água destilada, deionizada, autoclavada e gelada (4000rpm por 15min. a 4°C). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em aproximadamente 80µL de água gelada, misturado aos 10µL do inserto e depositado em cubeta de 0,2cm para eletroporação. A amostra foi submetida ao eletroporador Bio Rad calibrado com 2,5 Kv de voltagem, 200 Ohms de resistência e 25µFD de capacitância. À suspensão bacteriana, dentro da cubeta de eletroporação, acrescentaram-se, imediatamente após o pulso elétrico, 1,5mL de caldo SOC. A amostra foi, em seguida, incubada a 37°C por 1h e 30min. Decorrido este período a cultura foi centrifugada a 12000rpm por 2min, o precipitado ressuspendido em 100µL de PBS pH7,4 e plaqueado em Agar LB contendo 5µg/mL de Cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37°C por 24horas.

5.5.9. Seleção dos mutantes

Colônias SCI-07 Cm^r foram replaqueadas em Agar de MacConkey contendo 10µg/mL de Cloranfenicol e incubadas a 37°C por 24h e, novamente, plaqueadas em ágar LB e testadas por PCR para confirmação da recombinação homóloga entre o cassete de resistência ao antibiótico e o gene alvo. A reação de PCR foi realizada da seguinte forma: 5µL de Tampão 10X para PCR Fermentas; 15,6 µL de água ultra pura; 5 µL de DNTP mix (2mM cada); 0,4 µL Taq DNA polimerase; 2 µL de MgCl₂ (25mM); 0,5 µL de cada iniciador (10µM) e 1 colônia. O termociclador foi programado com 1º estágio de 95°C/3min (1ciclo), 2º estágio de 95°C/20seg, 55-60°C/1min, 72°C/30 seg a 2 min (25 ciclos) e 3º estágio de 72°C/5min (1 ciclo). Os amplicons foram submetidos ao gel de agarose a 1% sobre campo elétrico de 100V. O gel foi corado em solução de Brometo de Etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta.

5.6. Construção dos complementos dos mutantes

Os complementos dos mutantes foram contruídos no vetor de clonagem pACYC177 (Figura 4). Os genes originais com seus promotores, amplificados e clonados a partir do DNA genômico da linhagem SCI-07, foram inseridos, neste plasmídeo, entre os sítios das enzimas XhoI e HindIII para genes *feoA*, *entD*, *yehD*, *tyrR* e *bfr* e entre os sítios XhoI e SmaI para o gene *potF* pois este apresenta sítio para HindIII em sua sequência, ou entre os sítios DraIII e HindIII para os genes os quais aproveitou-se o promotor da Kanamicina do vetor para expressão do gene complementado (*nirC*, *flgE*, *csaA*). Ao iniciador de clonagem direta acrescentou-se a sequência de nucleotídeos para corte pela enzima XhoI ou DraIII e ao iniciador reverso a sequência de nucleotídeos para corte pela enzima HindIII ou SmaI. O produto da PCR foi purificado utilizando-se o Kit PureLink PCR Purification (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante. O plasmídeo pACYC177 foi extraído da linhagem hospedeira como descrito anteriormente para o plasmídeo PKD3.

Após a purificação, os fragmentos amplificados e o vetor plasmidial pACYC177 foram duplamente digeridos pelas enzimas de restrição (Fermentas) de acordo com as combinações descritas acima, seguindo a seguinte reação: 1,5µL de cada enzima; 20µL de DNA; 5µL de Red Buffer Fermentas e 22µL de água. Os 50µL finais de reação foram incubados a 37°C por 2 horas. Após a digestão, o vetor foi submetido à eletroforese e purificado do gel de agarose, utilizando-se o Kit “Qiaquick Gel Extraction” (Qiagen). Os insertos foram purificados pelo Kit “PureLink PCR Purification” (Invitrogen). Em seguida, procedeu-se à reação de ligação utilizando-se a enzima T4

DNA ligase (Fermentas), através da seguinte reação: 5µL do plasmídeo digerido; 5µL do inserto digerido; 1µL de ligase; 2µL de 10X buffer Ligase e 7µL de água, os 20µL finais de reação foram incubados a 22°C por 16 horas. A seguir, os plasmídios ligados foram purificados utilizando o Kit “PureLink PCR Purification” (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante e eletroporados em *E. coli* K12 linhagem DH10β, para a etapa de clonagem e multiplicação sendo posteriormente extraído e eletroporado nas bactérias mutantes, as quais foram selecionadas assim com a linhagem DH10β em placa de Ágar LB suplementadas com antibiótico Ampicilina (100µg/mL). Para a confirmação da complementação foram realizadas reações de PCR seguindo o descrito no item 6.4.

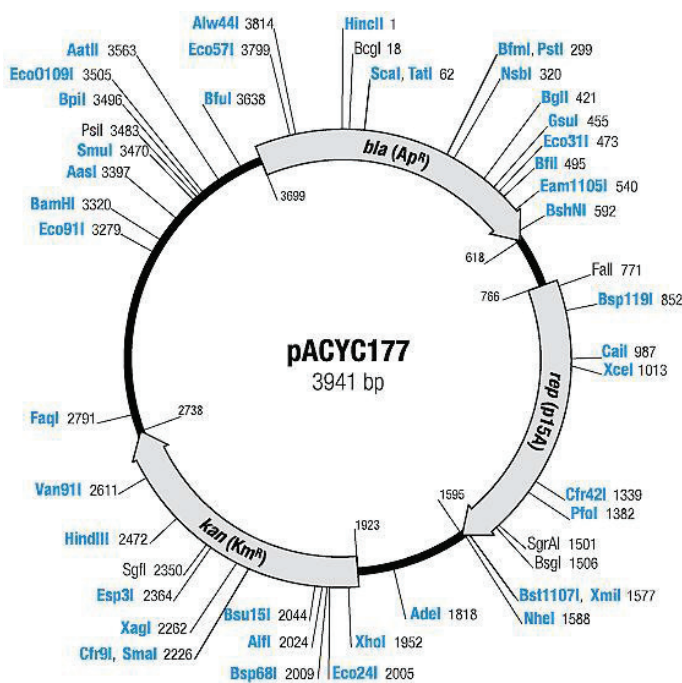


Figura 4. Mapa do vetor de clonagem pACYC177 utilizado para construção dos complementos (Fonte: New England Biolabs).

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes alvo de deleção no genoma da linhagem SCI -07.

Gene	Iniciador direto	Iniciador reverso	Pb*	Tm**
<i>flgE</i>	ATGGCCTTTTCTCAAGC GGT	GTTAACCAGCGTATTG AGGATC	1250	52°C
<i>entD</i>	ATCGTGTTGGCACAGC GTTA	GGACATACGCTGCATT TTGT	600	57°C
<i>nirC</i>	CCCTTTTTGCATGGTCC TGT	CGTCACCCACAGCAGG TTAT	790	60°C
<i>feoA</i>	TGGTCTCATGTCGCTGT CAA	TGATCGGTGGTGGAGA ATTG	460	60°C
<i>tyrR</i>	CTTTTTTCAGGTGAAGG TTCCC	ACCATCAGGCATATTC ACGC	1650	52°C
<i>yehD</i>	CCGATTAAAACCAGGG TGGC	GCACTCATTCTATCCAG GCA	300	53°C
<i>potF</i>	CCGAGCTATAGTCTCA AACC	GTGGTGCGCCCGTCCG GCAT	1350	62°C
<i>csgA</i>	TCAATCCGATGGGGGT TTTAC	GGCTTGCGCCCTGTTTC	500	62°C
<i>Bfr</i>	AACCGGGAGGGTTCTC CC	TCGTAAGCCGTTCTAC GCTTC	500	54°C

Pb tamanho do gene amplificado em pares de bases, **Tm temperatura de anelamento dos iniciadores.

Tabela 3. Sequência dos iniciadores utilizados na construção dos complementos dos mutantes na linhagem SCI- 07.

Gene	Iniciador direto	Iniciador reverso	Pb*	Tm**
<i>flgE</i>	AGTT <u>CACTCTGTGTCT</u> CAA AATATGGCCTTTTCTCAAG CGGT	GTAGA <u>AAGCTT</u> TGGCTGG CTGCTCCCA	1296	58°C
<i>entD</i>	AGTT <u>CACTCTGTGTCT</u> CAA AATGTGCGCGTAGTTCAT GCCGG	GTAGA <u>AAGCTT</u> GATGTTGT CAATTAAT	700	50°C
<i>nirC</i>	AGTT <u>CACTCTGTGTCT</u> CAA AATATGTTTACAGACACT ATTAC	GTAGA <u>AAGCTT</u> AATCAGA CAGTCGCGA	1007	58°C
<i>feoA</i>	AGTT <u>CTCGAGAGCC</u> ATAT CAACATTGAGTCAGATT	GTAGA <u>AAGCTT</u> TTAACAG GAAACCGCTTCCAC	500	59°C
<i>tyrR</i>	AGTT <u>CTCGAGTCGGT</u> CAG GTGAAAGAGACG	GTAGA <u>AAGCTT</u> TTACTCTT CGTTCTTCTTCTGACTCA G	1900	60°C
<i>yehD</i>	AGTT <u>CTCGAGTTAAT</u> CGT AGCGATTTAACACGATT	GTAGA <u>AAGCTT</u> AATGCTG CGAATATTCTGCG	450	59°C
<i>potF</i>	AGTT <u>CTCGAGAATT</u> AGCT CGCAACCTTCGG	GTAG <u>CCCGGGT</u> CATAGT GCTGCCGCGTT	1241	60°C
<i>csgA</i>	AGTT <u>CACTCTGTGTCT</u> CAA AATATGAACTTTTAAAA GTAGC	GTAGA <u>AAGCTT</u> CGCATTCA TATTCTTC	600	55°C
<i>Bfr</i>	CTCGAGTCAACCTTCTTCG CGAATCT	GTAGA <u>AAGCTT</u> GTGTCAGGC TGTGCGCCAGT	700	58°C

*Pb tamanho do gene amplificado em pares de bases, **Tm temperatura de anelamento dos iniciadores. As sequências sublinhas referem-se ao sítio para as enzimas, XhoI, HindIII, DraIII ou SmaI.

Tabela 4. Sequência dos iniciadores utilizados para deleção dos genes no genoma da linhagem SCl-07.

Gene	Iniciador direto	Iniciador reverso
<i>flgE</i>	CTCAAGCGGTTAGCGGATTAAACGTTGCCGCCACC AACCTCGATGTTAT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	CACCAGTGTGTGCTGCTCTTCGCAATGCTGTTTGGATCACTA CTATCCT CATATGAATATCCTCCTTAG
<i>entD</i>	ATCGTGTGGCACAGCGTTATGACTATTTTCTCTTT ATCTGCCAGTGC GTAGGCTGGAGCTGCTTC	AAACTACGCATACCTCCCTCCCTTTGCAGGACATACGCTG CATTTGT CATATGAATATCCTCCTTAG
<i>nirC</i>	TTTAAACTTTTGTGTTTATTTTGTGTTTATTTT AAGGATAATCAAG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	CGTAATTGGCAAAATATAGGCAATATGCCACGTAAAAACCC CTTAGTAACATATGAATAT CCTCCTTAG
<i>feoA</i>	CGTAATTGGCAAAATATAGGCAATATGCCACGTA AAAACCCCTTAGTAACATATGAATAT CCTCCTTAG	GATTACCAATTAAAGCCAATGGTTAATTTTTCATTGTTGTTAT CACCGTACATATGAATAT CCTCCTTAG
<i>bioB</i>	TACGAGTCTACACCGAATTAAACAACAAAAACACG TTTTGGAGAAAGCCCC GTAGGCTGGAGCTGCTTC	ATCAGCAACACGCCGCGCATCAAGCGCCGCTCGATTTCCTC CTGCCAGACATATGAATAT CCTCCTTAG
<i>tyrR</i>	ATAGTGCATATCATCATATTAATTGTTCTTTTCA GGTGAAAGGTTCCCG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	AGCATAAGTTAATATGCCTGATGGTGTGCACCATCAGGCAT ATTCACGCCATATGAATAT CCTCCTTAG
<i>yehD</i>	CATGTAATGATTAAAGCTTTCTAAATCCGATTAAA ACCAGGTGGCAAAG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	GTTATGCACTCATTTCTATCCAGGCATAACCTTTACTACAGGG ATAACGTTACATATGAATAT CCTCCTTAG
<i>potF</i>	TTTTTTAATCCGAGCTATAGTCTCAAAACCCCTGGCTA AAGTTATTCTTGC GTAGGCTGGAGCTGCTTC	TGCGAATTGCCGGCGGGTGTGGTGCGCCCTCCGGCATCTAC GGCTGGGACATATGAATAT CCTCCTTAG
<i>Bfr</i>	TCTGGCCTGGATCTCTTATTAAACGGGAGGGTTCTC CCTCCCGACACGG GTAGGCTGGAGCTGCTTC	ACTCGTAAGCCGTTCTACGCTTCAAAAGAGTGGAAGCGAAGGA GTCAAAAACATATGAATAT CCTCCTTAG

As sequências de bases sem realce referem-se aos 50pb homólogos ao gene alvo da deleção, as sequências em negrito referem-se aos 20pb para amplificação do cassete de resistência ao Cloranfenicol, a partir do plasmídeo pKD3. O cassete de cloranfenicol tem em torno de 1000 pares de bases e os iniciadores para sua amplificação apresentam temperatura de anelamento de 55°C.

5.7. Ensaio de adesão a Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG)

Os mutantes obtidos e a linhagem selvagem foram avaliados quanto às suas habilidades de adesão às células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) na presença e na ausência de um análogo da manose, methyl- α -D-mannopyranoside (Sigma, USA), um antagonista da Fímbria do tipo 1 (Abgottspon *et al.*, 2010). A aderência de *E. coli* às células FEG foi detectada pela redução de tetrazolium dye MTT a formazana conforme descrito anteriormente (Zaas *et al.*, 2005) e pela determinação do número de bactérias viáveis aderidas à superfície das células pré-fixadas. As células foram crescidas em placa de 96 poços por 18 h em DMEM 10% soro fetal bovino até atingir a confluência. As células foram fixadas gradativamente com solução de paraformaldeído 0,75%, 1,15% e 1,5%, com 30 min de incubação em cada solução. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS pH7,4 esterilizado e, em seguida, bloqueados utilizando 100 μ L de DMEM BSA 2%, por 1 hora. O inóculo bacteriano foi crescido em meio LB por 18 horas a 37°C, na presença (1%) e na ausência do análogo de manose Methyl α -D-Mannopyranoside (Sigma) e diluído até a D.O. 0,5. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS pH7,4, e para a infecção, foram adicionados 50 μ L do inóculo bacteriano, por um tempo de 1 hora de incubação a 37°C em 5% CO₂. O meio foi, então, descartado, os poços lavados 3 vezes com PBS pH 7,4 e, 100 μ L de meio LB adicionados para incubação por 3 horas a 37°C em 5% CO₂. Em seguida, os poços foram lavados 6 vezes com PBS pH7,4, e 100 μ L de MTT (2 mg/ml) adicionados. A placa foi envolvida por papel alumínio para incubação por 1 h a 37°C em 5% CO₂. O MTT foi removido e acrescentaram-se 100 μ L da solução de extração Álcool isopropílico e HCl 1N (24:1). A absorbância foi lida a 570 nm. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 Beta (2012). A linhagem *E. coli* HB101 foi utilizada como controle negativo.

5.8. Ensaio de Invasão em células CEC32 e Hep-2 cultivadas *in vitro*

Os mutantes obtidos e a linhagem selvagem foram avaliados quanto às suas habilidades de invasão em células de fibroblasto aviárias (CEC32) (Kaaden *et al.* 1982) e células humanas de carcinoma de laringe (Hep-2). Ambos os tipos celulares foram crescidas por 48 h em DMEM em placa de 24 poços. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS pH7,4 esterilizado (37°C). A infecção foi realizada em DMEM com 10% soro fetal bovino, adicionando-se as linhagens, em multiplicidade de infecção (MOI) de 150 UFC por célula, e a placa incubada por 1 h a 37°C, em

5% de CO₂. O meio foi, então, descartado e os poços lavados 2 vezes com PBS pH7,4. Em seguida, 1 ml de DMEM 10% soro fetal bovino contendo 50 µg/ml de Ampicilina foi adicionado aos poços, e a placa incubada por 1 h a 37°C em 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lisadas e plaqueadas para contagem de suas bactérias. A suspensão obtida foi diluída (em diluições seriadas 1:10) e plaqueadas em meio ágar de MacConkey. O número de unidades formadoras de colônias por mL foi determinado e transformado em Log₁₀. Cada experimento foi realizado em triplicata. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 Beta (2012). A linhagem *E. coli* HB101 foi utilizada como controle negativo.

5.9. Ensaio de Sobrevivência em Macrófago

Neste ensaio, foi utilizada a linhagem de macrófago HD11 de galinhas transformadas com o vírus *Mielocytomatosis* (MC29) (Beug *et al.*, 1979). Para a infecção, os macrófagos foram cultivados por 18 h em placa de 24 poços, a $7,5 \times 10^4$ células/cm² em meio de infecção constituído de RPMI contendo 2 mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS pH7,4 esterilizado (37°C). A infecção foi realizada em meio de infecção, adicionando-se as linhagens, em multiplicidade de infecção (MOI) de 150 UFC por célula. A incubação ocorreu por 1 hora a 37°C, em 5% de CO₂. O meio foi, então, descartado e os poços lavados 2 vezes com PBS pH7,4. Em seguida, 1 ml de meio de infecção contendo 50 µg/ml de Ampicilina ou Canamicina apropriadas para cultivo celular (Sigma) foi adicionado aos poços, e a placa incubada por 1 h a 37°C em 5% de CO₂. Após a incubação, o meio foi descartado e os poços lavados 2 vezes com PBS pH7,4. O meio de infecção foi, novamente, adicionado (1 ml), no entanto dessa vez, contendo 10µg/mL dos referidos antibióticos, seguido de incubação por 3 e 18 horas a 37°C em 5% de CO₂. O meio foi descartado e os poços lavados mais uma vez com a placa sendo incubada com Triton X-100 1% por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a suspensão obtida foi diluída (em diluições seriadas 1:10) e plaqueadas em meio Ágar de MacConkey. O número de unidades formadoras de colônias por mL foi determinado e transformado em Log₁₀. Cada experimento foi realizado em triplicata. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 Beta (2012). A linhagem *E. coli* HB101 foi utilizada como controle negativo.

5.10. Quantificação da transcrição através de qRT-PCR

Os iniciadores foram construídos utilizando-se o programa “Primer Express Software Version 3.0” (Applied Biosystems®, EUA), e são apresentados na Tabela 5. Os experimentos foram realizados em reação de passo único utilizando o “ABI StepOne Plus Real-Time PCR” (Applied Biosystems), segundo o programa: um ciclo de “Holding Stage” de 30 min a 48°C e 10 min a 95°C, 40 ciclos de “Cycling Stage” de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C, e um ciclo de “Melt Curve Stage” de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Cada reação continha 6 µl de 2X SYBR Green Reaction Mix with Rox, 0,25 µl de SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen), 100 nM de cada iniciador, 1 ng/µl RNA e água DEPC suficiente para um volume final de 12 µl. A eficiência da amplificação de cada par de iniciadores foi verificada utilizando-se curvas padrões de concentrações de RNA conhecidas. Os dados foram normalizados utilizando níveis de expressão do gene *rpoA* (subunidade A da RNA polimerase) e analisados utilizando o método “comparative critical threshold” (C_T) (Walters *et al.*, 2006). A coleção de dados foi analisada utilizando-se o programa “Step One Software v.2.1” (Applied Biosystems®, EUA). As barras de erros representam os desvios padrão dos valores C_T .

Tabela 5. Sequência dos iniciadores utilizados para PCR em tempo real.

Gene	Iniciador direto	Iniciador reverso
<i>rpoA</i>	GCGCTCATCTTCTTCCGA	CGCGGTCGTGGTTATGTG
<i>nirC</i>	GCCGGTAGATACCAGCATCGT	TGCCGGTGCAGTGGTTTTA
<i>nsrR</i>	CGGCATTCGCTTGGGTAA	CGCACCCACATCACCAATACG
<i>Hmp</i>	CGCTCAAACCATCGCTACAG	GGTCCCGTTTCCACCAGTAA
<i>ytfE</i>	GGCGGTGTGACGTTATTGG	GATGAAGCGGGCGAACTG

5.11. Curva de Crescimento

Culturas crescidas à noite, em meio LB, foram ajustadas para a mesma densidade com base na OD₆₀₀, diluídas na proporção 1:100 e cultivadas em DMEM e em LB a 37°C com agitação de 150 r.p.m. A OD₆₀₀ foi medida a cada 0,5 h até que a cultura atingisse a fase estacionária.

5.12. Ensaio de motilidade do tipo “swimming”

Para esse ensaio, placas de *Petri* contendo 30 ml de LB com 0,3% de Ágar foram utilizadas. Pontos determinados nas placas foram inoculados com auxílio de um estilete umedecido em culturas da linhagem SCI-07 e das linhagens mutantes, preparadas em caldo LB por 18 h a 37°C. As placas foram incubadas a 37° por 12 h, e após esse intervalo, procedeu-se à aferição dos halos de motilidade. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 Beta (2012).

5.13. Ensaio de Formação de Biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado como descrito por Christensen *et al.*, (1985), com algumas alterações. Brevemente, as linhagens foram crescidas por 18 h em LB, a 37°C e, a seguir, inoculadas em meio DMEM, diluídas 1:100, em placa de cultura celular de 24 poços (placa de poliestireno de alta transparência), em um volume final de 1 ml. As placas foram incubadas a 37°C (estufa de CO₂ a 5%), por 24 e 48 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi aspirado e os poços lavados por duas vezes com PBS pH 7,4. O biofilme foi fixado com 1 ml de etanol 75% por 10 min e lavado por duas vezes com PBS pH 7,4, para remoção do etanol. A coloração foi realizada utilizando-se solução 0,5% de cristal violeta, por 5 min. Após três lavagens com PBS, as placas foram secas à temperatura ambiente e o cristal violeta solubilizado com adição de 1 ml de etanol 95%, por dois minutos. Após este período de tempo, iniciou-se a quantificação da formação de biofilme. Para a quantificação, 70 µl da solução foram transferidos para uma cubeta e a absorbância determinada utilizando o espectrofotômetro Biospectrometer (Eppendorf). A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 Beta (2012).

5.14. Ensaios *in vivo*

Todos os ensaios em animais foram aprovados pelo “Comitê de Ética para Uso Animal-CEUA-Unicamp” (Protocolo numero 2669-1) seguindo a legislação brasileira vigente N° 11794.

Para a determinação da patogenicidade das linhagens mutantes através da avaliação da mortalidade, aves de corte da linhagem comercial Cobb com um dia de vida, não vacinadas no incubatório, foram inoculados pela via do saco aéreo. Grupos de 20 aves receberam 0,1 mL dos inóculos contendo 10^8 UFC/mL. Os inóculos constituíram-se de 10 mL de cultura das linhagens mutantes, de seus complementos ou da linhagem selvagem, preparadas em caldo LB, incubadas a 37°C por 18 horas em agitação (150 rpm). As culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento bacteriano ressuspensionado em 10 mL de PBS pH 7,4. Volumes de 0,1mL do lavado bacteriano foram injetados diretamente no saco aéreo torácico direito, com o auxílio de uma seringa de insulina. As aves foram observadas a cada 12 horas contabilizando-se a mortalidade até sete dias após a inoculação. Ao fim do período de observação, os sobreviventes foram sacrificados, procedendo-se à necropsia e avaliação das lesões. A taxa de mortalidade média das aves foi comparada pelo teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

6. Resultados

6.1. Construção dos mutantes pela técnica de “Lambda Red” e posterior complementação com plasmídeo pACYC177.

A Figura 5 apresenta a confirmação da presença do plasmídeo pKD46 na linhagem selvagem SCI-07, este plasmídeo carrega o sistema “Lambda Red” que permite às bactérias sofrerem recombinação homóloga pela inserção de fragmentos exógenos de DNA linear. Seguem a esta figura uma série de outros nove conjuntos de figuras (Figuras de 6 a 14) os quais apresentam a confirmação da construção dos nove mutantes nulos: $\Delta nirC$, $\Delta tyrR$, $\Delta csgA$, $\Delta potF$, $\Delta yehD$, Δbfr , $\Delta flgE$, $\Delta feoA$ e $\Delta entD$, respectivamente, no genoma da SCI-07 (Figuras de 6 a 14 A) bem como a construção dos nove complementos dos mutantes no plasmídeo pACYC177 (Figuras de 6 a 14 B).

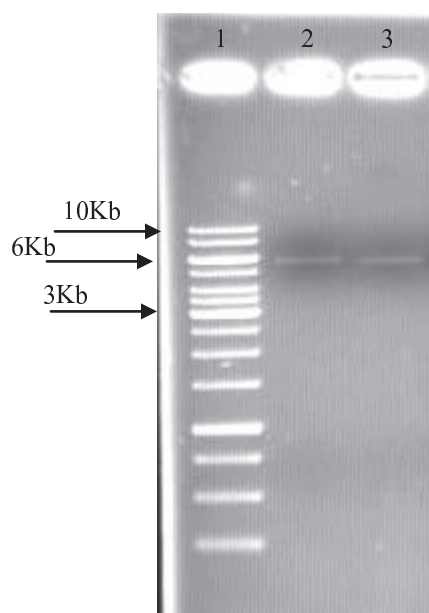


Figura 5. Eletroforograma em gel de agarose (0,8%) demonstrando a presença do plasmídeo pKD46 na linhagem SCI0-07. Na primeira coluna observa-se o marcador molecular 1Kb (usado apenas para orientar a migração), na segunda coluna verifica-se a presença do plasmídeo pKD46Amp extraído da cultura de SCI-07 transformada e na terceira coluna, o plasmídeo pKD46 extraído da linhagem DH10β.

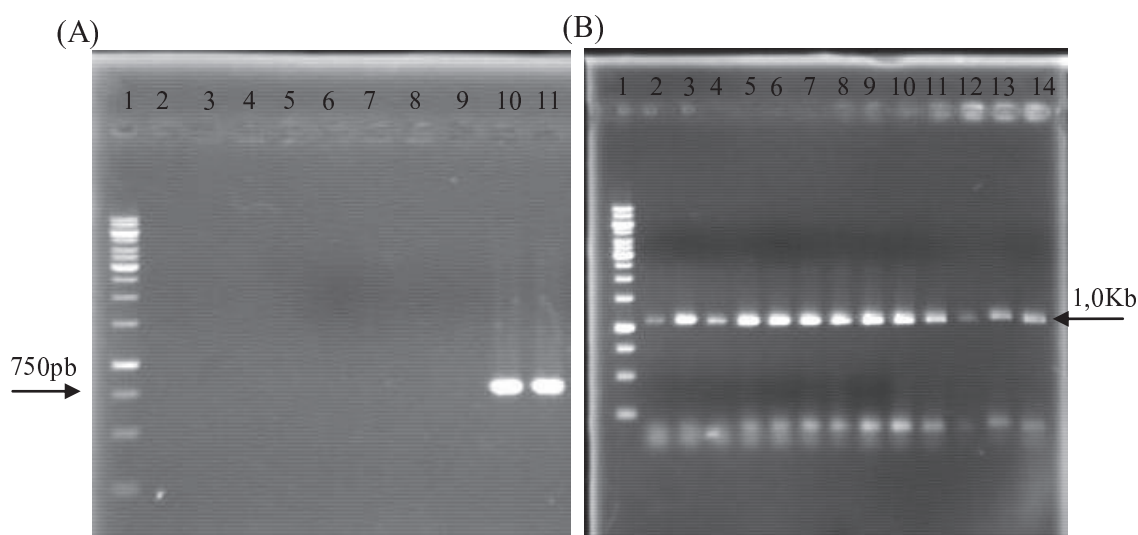


Figura 6. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 $\Delta nirC$ através da amplificação do gene *nirC* na linhagem mutante SCI-07 $\Delta nirC$ em comparação à linhagem selvagem SCI-07 pela utilização de pares de iniciadores internos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda à nona coluna colônias suspeitas de serem mutantes $\Delta nirC$ (ausência de “amplicon”) e na décima primeira e décima segunda colunas a linhagem SCI-07 (controle 750pb). (B) Confirmação da construção do plasmídio complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *nirC*. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb da segunda a décima segunda colunas gene *nirC* amplificado de plasmídios pACYC177 suspeitos de carregarem a construção e na décima terceira e décima quarta colunas gene *nirC* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle).

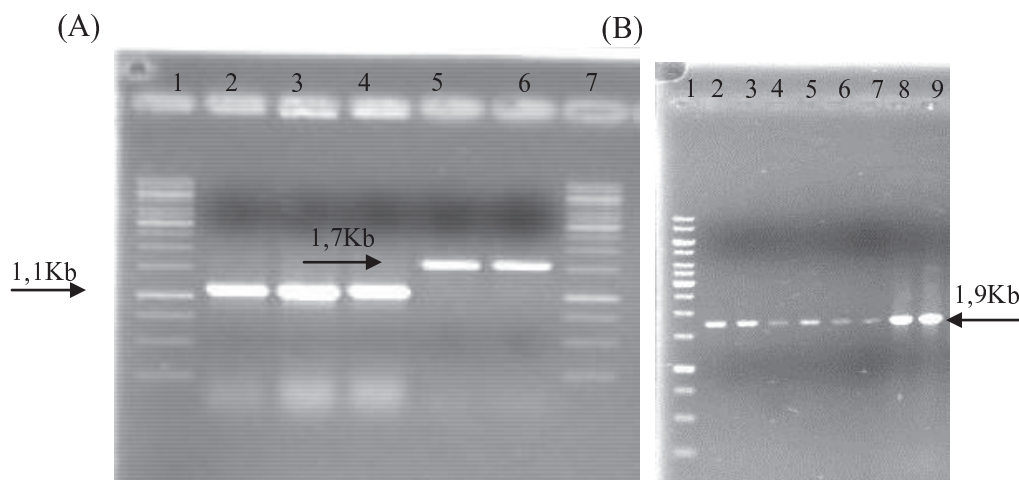


Figura 7. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 $\Delta tyrR$ através da amplificação do gene *tyrR* na linhagem mutante SCI-07 $\Delta tyrR$ em comparação à linhagem selvagem SCI-07 pela utilização de pares de iniciadores externos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda à quarta coluna colônias suspeitas de serem mutantes $\Delta tyrR$ (“amplicon” de 1,1Kb) e na quinta e sexta coluna a linhagem SCI-07 (controle 1,7Kb). (B) Confirmação da construção do plasmídio complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *tyrR*. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb da segunda a sétima colunas gene *tyrR* amplificado de plasmídios pACYC177 suspeitos de carregarem a construção e na oitava e nona colunas gene *tyrR* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle).

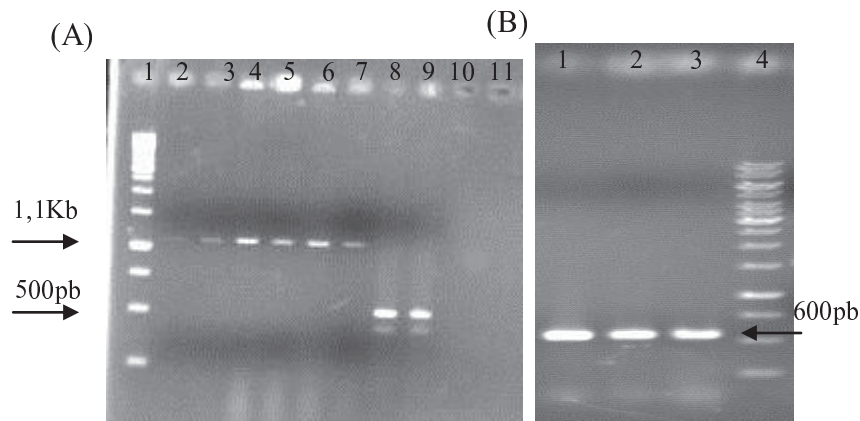


Figura 8. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 $\Delta csgA$ através da amplificação do gene *csgA* na linhagem mutante SCI-07 $\Delta csgA$ em comparação à linhagem selvagem SCI-07, pela utilização de pares de iniciadores externos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda à sétima colunas colônias suspeitas de serem mutantes $\Delta tyrR$ (“amplicon” de 1,1Kb) e na oitava e nona colunas a linhagem SCI-07 (controle 500pb). (B) Confirmação da construção do plasmídio complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *csgA*. Na primeira coluna: gene *csgA* amplificado de plasmídio pACYC177 suspeito de carregar a construção, na segunda e terceira colunas gene *csgA* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle) e na quarta coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb.

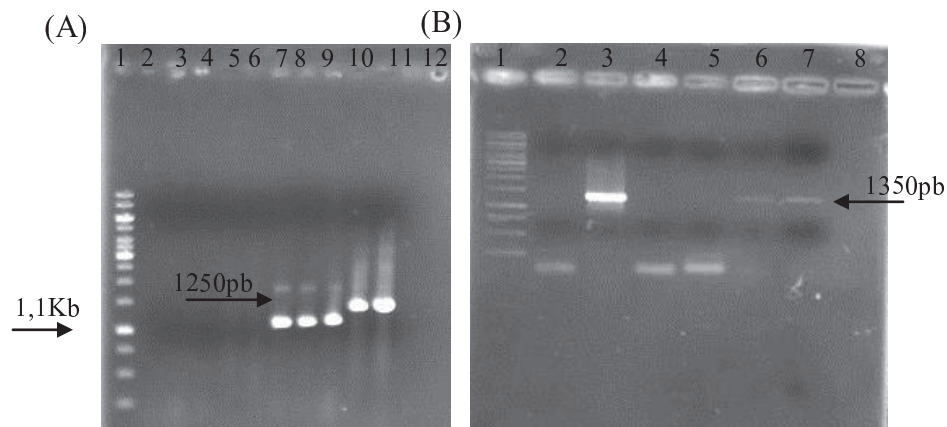


Figura 9. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 $\Delta potF$ através da amplificação do gene *potF* na linhagem mutante SCI-07 $\Delta potF$ em comparação à linhagem selvagem SCI-07 pela utilização de pares de iniciadores externos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da sétima à nona colunas colônias suspeitas de serem mutantes $\Delta potF$ (“amplicon” de 1,1Kb) e na décima e décima primeira colunas a linhagem SCI-07 (controle 1,2 Kb). (B) Confirmação da construção do plasmídeo complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *potF*. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda a quinta colunas gene *potF* amplificado de plasmídios pACYC177 suspeitos de carregarem a construção (apenas um foi positivo) e na sexta e sétima colunas gene *potF* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle).

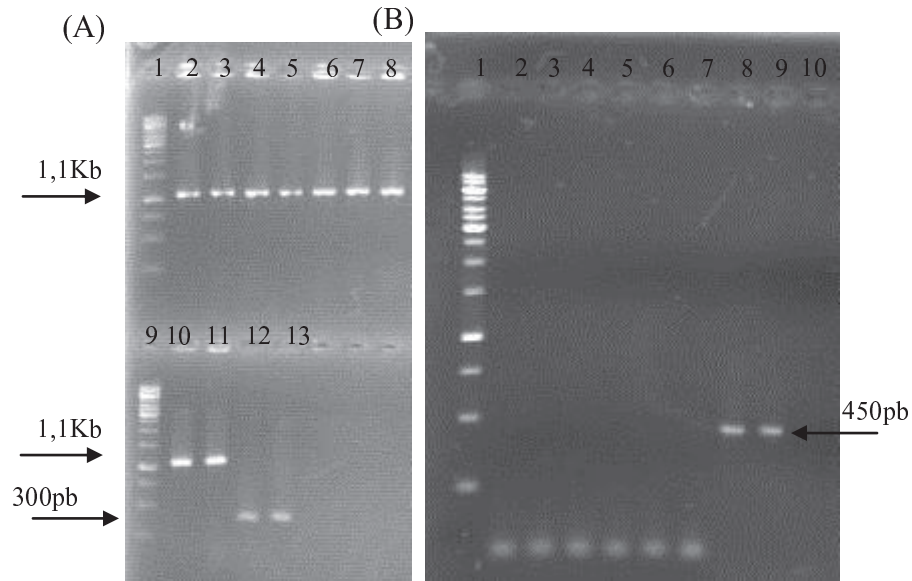


Figura 10. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 $\Delta yehD$ através da amplificação do gene *yehD* na linhagem mutante SCI-07 $\Delta yehD$ em comparação à linhagem selvagem SCI-07 pela utilização de pares de iniciadores externos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda à décima colunas colônias suspeitas de serem mutantes $\Delta yehD$ (“amplicon” de 1,1Kb) e na décima primeira e décima segunda colunas a linhagem SCI-07 (controle 300 pb). (B) Confirmação da construção do plasmídio complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *yehD*. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb da segunda a oitava colunas gene *yehD* amplificado de plasmídios pACYC177 suspeitos de carregarem a construção (apenas um foi positivo) e na nona coluna gene *yehD* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle).

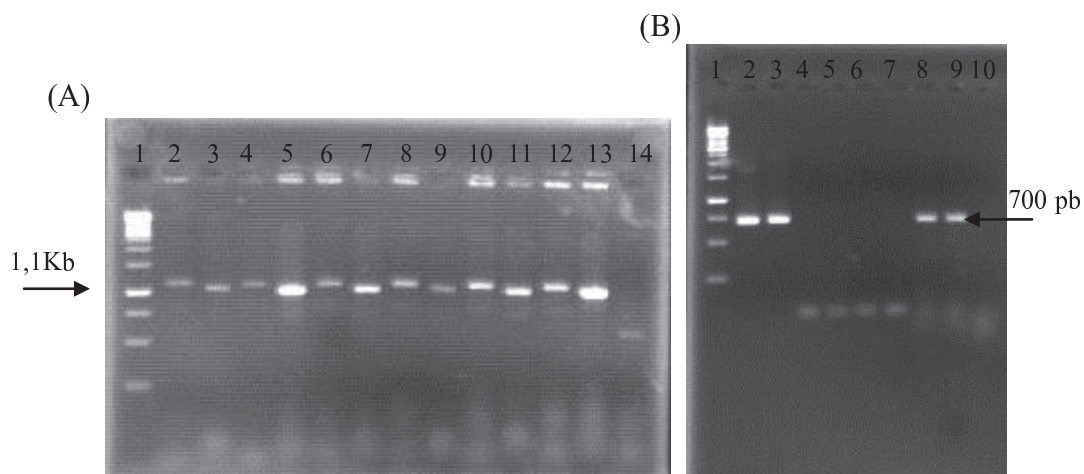


Figura 11. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 Δbfr através da amplificação do gene *bfr* na linhagem mutante SCI-07 Δbfr em comparação à linhagem selvagem SCI-07 pela utilização de pares de iniciadores externos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda à décima terceira colunas colônias suspeitas de serem mutantes Δbfr (“amplicon” de 1,1Kb) e na décima quarta colunas a linhagem SCI-07 (controle 500 pb). (B) Confirmação da construção do plasmídio complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *bfr*. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda a sétima colunas gene *bfr* amplificado de plasmídios pACYC177 suspeitos de carregarem a construção (apenas dois foram positivos) e na oitava e nona colunas gene *bfr* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle).

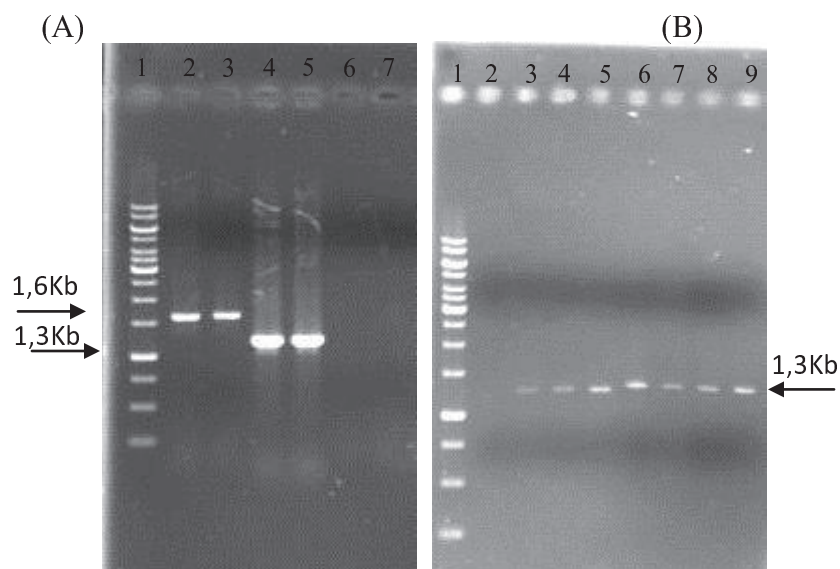


Figura 12. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 $\Delta flgE$ através da amplificação do gene *flgE* na linhagem mutante SCI-07 $\Delta flgE$ em comparação à linhagem selvagem SCI-07 pela utilização de pares de iniciadores externos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, na segunda e terceira colunas colônias suspeitas de serem mutantes $\Delta flgE$ (“amplicon” de 1,6Kb) e na quarta e quinta colunas a linhagem SCI-07 (controle 1,3 Kb). (B) Confirmação da construção do plasmídio complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *flgE*. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda a sétima colunas gene *flgE* amplificado de plasmídios pACYC177 suspeitos de carregarem a construção (cinco foram positivos) e na oitava e nona colunas gene *flgE* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle).

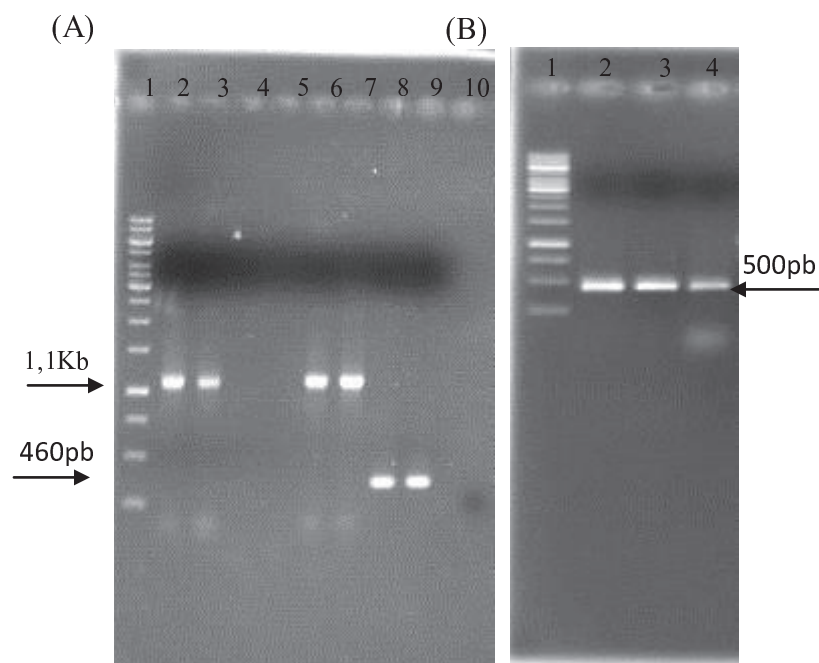


Figura 13. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 $\Delta feoA$ através da amplificação do gene *feoA* na linhagem mutante SCI-07 $\Delta feoA$ em comparação à linhagem selvagem SCI-07, pela utilização de pares de iniciadores externos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda a sétima colunas colônias suspeitas de serem mutantes $\Delta feoA$ (“amplicon” de 1,1Kb), e na nona e décima colunas a linhagem SCI-07 (controle 460 pb). (B) Confirmação da construção do plasmídeo complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *feoA*. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, na segunda coluna gene *feoA* amplificado de plasmídeo pACYC177 suspeito de carregar a construção e na terceira e quarta colunas gene *feoA* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle).

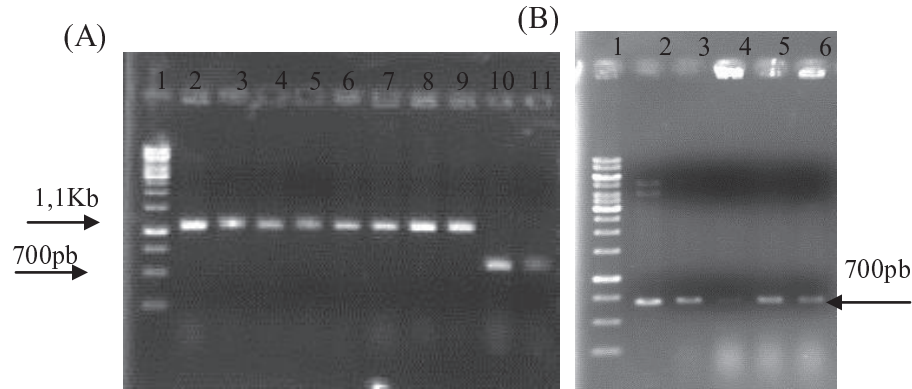


Figura 14. Eletroforograma em gel de agarose (1%). (A) Confirmação da construção do mutante SCI-07 $\Delta entD$ através da amplificação do gene *entD* na linhagem mutante SCI-07 $\Delta entD$ em comparação à linhagem selvagem SCI-07, pela utilização de pares de iniciadores externos ao gene. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda a nona colunas colônias suspeitas de serem mutantes $\Delta entD$ (“amplicon” de 1,1Kb), e na décima e décima primeira colunas a linhagem SCI-07 (controle 600 pb). (B) Confirmação da construção do plasmídio complementado pACYC177 carregando cópia clonada do gene original *entD*. Na primeira coluna: marcador de tamanho molecular 1Kb, da segunda a quarta colunas gene *entD* amplificado de plasmídio pACYC177 suspeito de carregar a construção e na quinta e sexta colunas gene *entD* amplificado a partir da linhagem SCI-07 (controle).

6.2. Avaliação da motilidade do tipo “Swimming” e formação de biofilme

Com o intuito de avaliar a influência das deleções no fenótipo de motilidade do tipo “swimming” o diâmetro dos halos de motilidade em placas de LB contendo 0,3% Agar foi mensurado após 12 horas da inoculação com culturas das linhagens mutantes e selvagem. Os mutantes $\Delta yehD$, Δbrf , $\Delta nirC$ e $\Delta csgA$ mostraram-se mais móveis que o da linhagem selvagem SCI-07 ($p < 0,01$; Figura 15 A), o halo de motilidade do mutante $\Delta tyrR$ foi menor que o da linhagem selvagem, indicando comprometimento na motilidade pela deleção do gene *tyrR* ($p < 0,01$; Figura 15 A). O mutante $\Delta flgE$ foi totalmente imóvel (Figura 15), no entanto a linhagem *flgE* complementada não restaurou a motilidade.

A linhagem selvagem SCI-07 mostrou-se incapaz de formar biofilme pela metodologia adotada neste trabalho, por isso resultados referentes aos mutantes e complementos não foram apresentados.

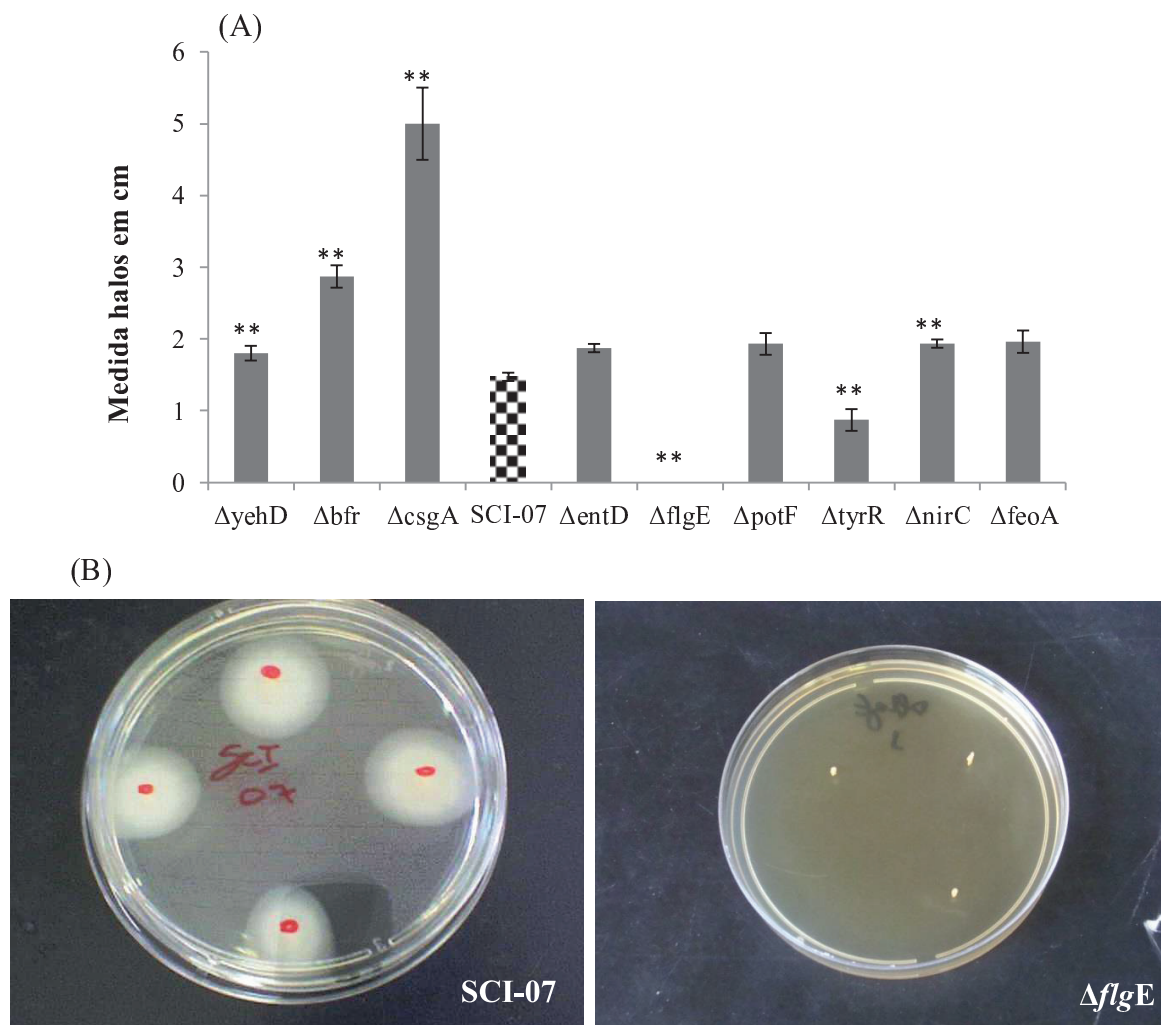


Figura 15. Motilidade do tipo *Swimming*. (A) Medidas dos halos do ensaio de motilidade após 12 h. Diferença estatística determinada pelo teste de Tukey em comparação com a motilidade da linhagem selvagem (** $p < 0,01$). (B) Demonstração do tamanho padrão de halo de motilidade da linhagem SCI-07 e do mutante imóvel $\Delta flgE$.

6.3. Adesão em células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG)

A capacidade das linhagens mutantes em aderir às células FEG foi avaliada em comparação à linhagem selvagem, com o intuito de se entender a influência de cada deleção neste fenótipo. O número de bactérias que aderiram às FEG pré-fixadas foi significativamente menor para os mutantes Δbfr , $\Delta csgA$ e $\Delta nirC$ na presença (Figura 16 A) e na ausência (Figura 16 B) do alpha-D-mannopyranoside ($p < 0,01$) sugerindo que esses genes são importantes para a adesão da linhagem SCI-07 em ambos os modelos adotados. O mutante $\Delta potF$ mostrou diminuição da

capacidade de aderir às células FEG apenas na ausência do alfa-D-mannopiranoside ($p < 0,05$; Figura 16 B) sugerindo que este gene está associado a capacidade de adesão dependente da fimbria do tipo 1. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101.

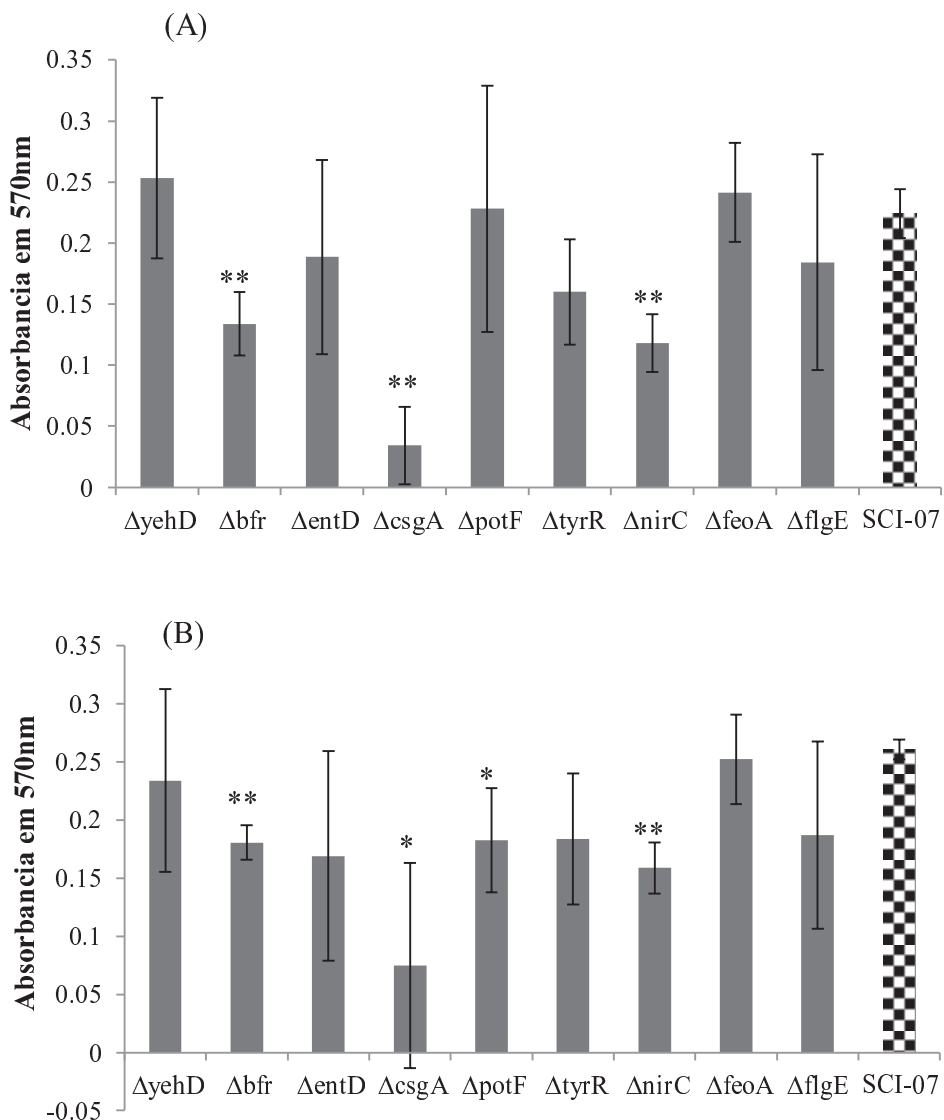


Figura 16. Quantificação da adesão à linhagem celular Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG) na presença (A) e na ausência (B) do análogo da manose methyl-alpha-D-mannopyranoside. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey em comparação à linhagem selvagem (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

6.4. Invasão em células CEC-32

A habilidade das linhagens mutantes em invadir as linhagens celulares CEC-32 (fibroblasto de embrião de galinha) em comparação à linhagem selvagem SCI-07 foi testada. Nenhuma diferença significativa foi verificada no número de bactérias mutantes recuperadas das células CEC-32 em comparação ao número de bactérias selvagens recuperadas ($p > 0,05$; Figura 17), no entanto, o mutante $\Delta tyrR$ mostrou uma diminuição na capacidade de invadir esta linhagem celular, ainda que sem significado estatístico (Figura 17; $p > 0,05$). Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101.

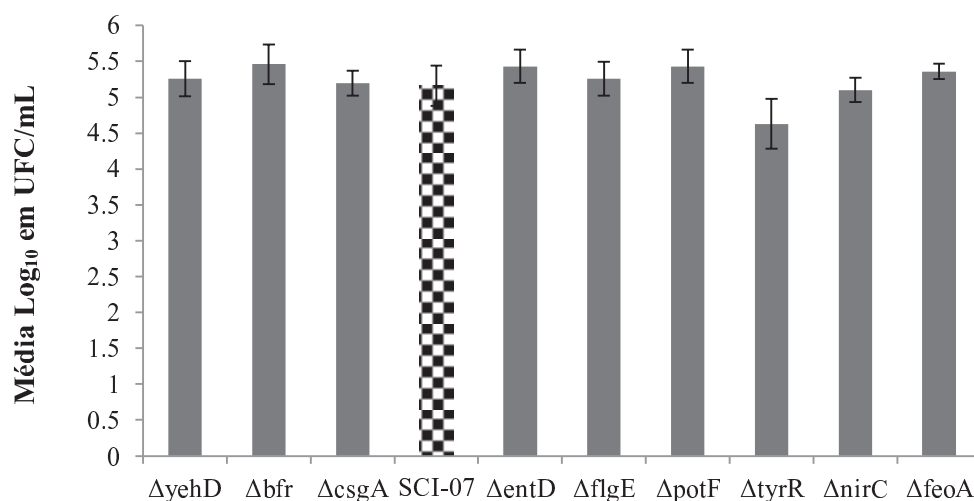


Figura 17. Ensaio de invasão das linhagens mutantes em comparação à selvagem em fibroblastos de embrião de galinha, linhagem CEC32. Não houve diferença significativa determinada pelo teste de Tukey dos mutantes em comparação com a linhagem selvagem ($p > 0,05$).

6.5. Invasão em células Hep-2

A habilidade dos mutantes nulos em invadir a linhagem celular de laringe humana Hep-2 foi investigado em comparação a linhagem selvagem SCI-07. Nós verificamos que os mutantes $\Delta tyrR$, $\Delta csgA$ e $\Delta flgE$ apresentaram menores números de bactérias intracelulares recuperadas das células Hep-2 em comparação à linhagem selvagem, ainda que, sem significado estatístico para o mutante $\Delta flgE$ (Figura 18).

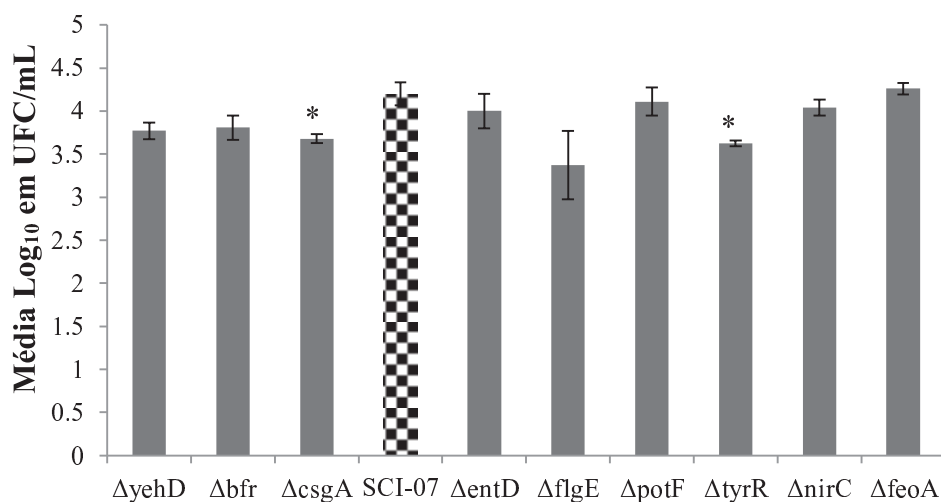


Figura 18. Ensaio de invasão das linhagens mutantes em comparação à selvagem em Hep-2. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey dos mutantes em comparação à linhagem selvagem (* $p < 0,05$).

6.6. Ensaio de sobrevivência em macrófagos de ave

Os resultados mostraram que os mutantes $\Delta flgE$ e $\Delta tyrR$ apresentaram menor capacidade de sobrevivência intra-macrófago que a linhagem selvagem após 3 horas de infecção ($p < 0,05$; Figura 19). O mutante $\Delta nirC$, por sua vez, apresentou a mesma capacidade de sobrevivência intra-macrófago após 3 horas de infecção, no entanto, após 16 horas este mutante mostrou-se mais hábil em sobreviver dentro dos macrófagos de aves que a linhagem selvagem, indicando que o gene *nirC* estaria envolvido em algum mecanismo de sobrevivência intra-macrófago. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101.

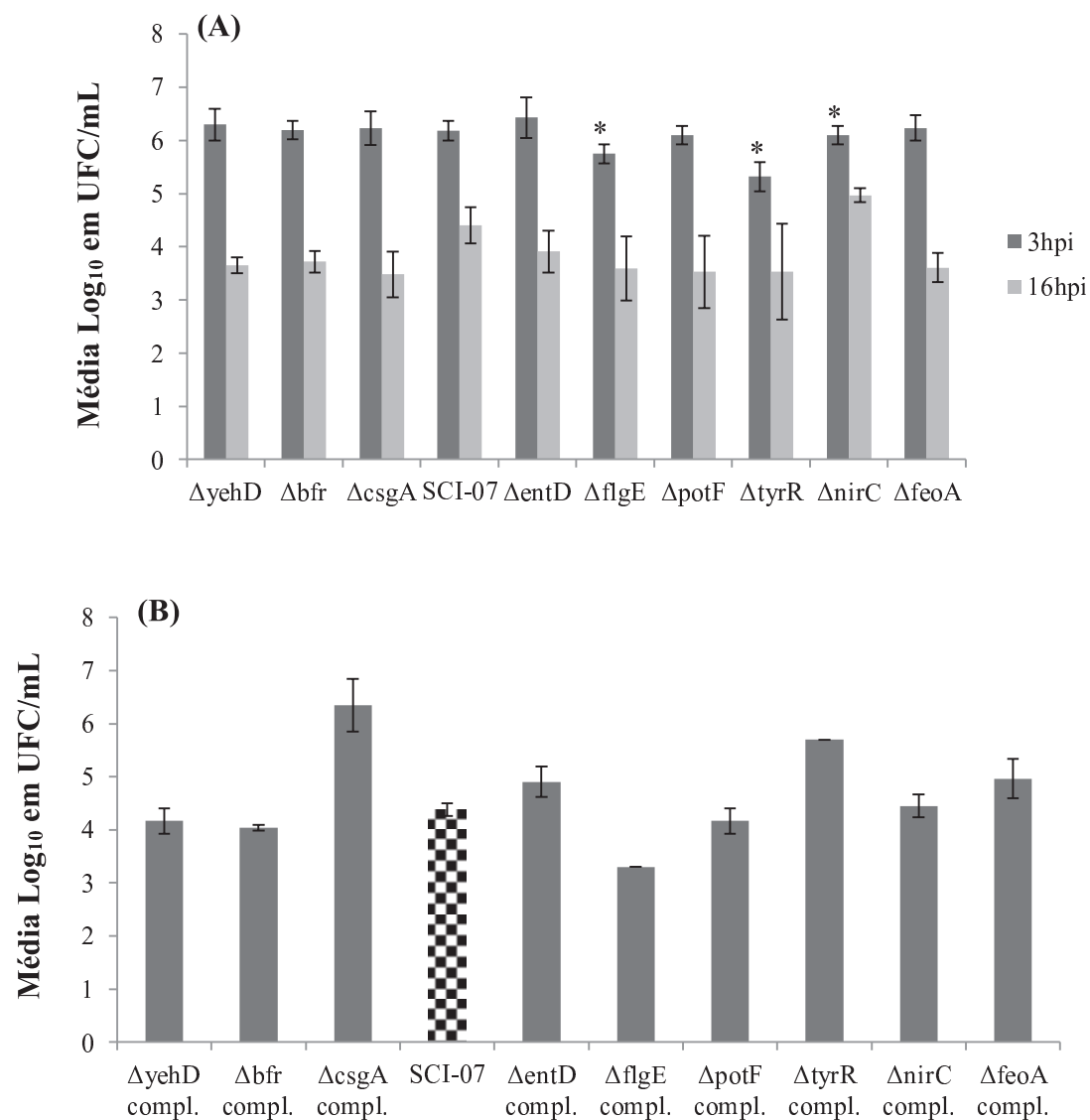


Figura 19. Sobrevivência em macrófagos (linhagem HD11). (A) linhagens mutante e selvagem em macrófagos de aves após 3 ou 16 horas pós-infecção (hpi). Diferença estatística determinada pelo teste de Tukey em comparação à linhagem selvagem para cada intervalo de tempo (* $p < 0,05$). (B) linhagens complementadas e selvagem em macrófagos de aves após 3 horas de infecção.

6.7. Avaliação da mortalidade em aves

Ensaio *in vivo* foram utilizados para avaliar a patogenicidade das linhagens mutantes em comparação à linhagem selvagem SCI-07. Para tanto, grupos de 20 aves com um dia de vida (linhagem COBB) foram infectados com as linhagens mutantes, complementadas e selvagem. A linhagem selvagem alcançou 65% de mortalidade durante sete dias avaliados, esta porcentagem foi alcançada apenas pelo mutante $\Delta csgA$. Para os outros mutantes a mortalidade cumulativa foi de 60% para $\Delta yehD$, 55% para $\Delta flgE$, 50% para Δbfr , 45% para $\Delta tyrR$, 35% para $\Delta potF$ e 0% para $\Delta entD$, mostrando total atenuação deste mutante para aves de um dia ($p < 0,01$) (Figura 20 A). O mutante $\Delta feoA$, por sua vez, tornou-se mais virulento que a linhagem selvagem causando 85% de mortalidade ($p < 0,05$). Se considerarmos o primeiro dia de vida a capacidade inicial de causar mortalidade do mutante $\Delta potF$ foi significativamente inferior comparado à linhagem selvagem ($p < 0,05$). Todos as linhagens complementadas com exceção de *entD*, restauraram o perfil de mortalidade assemelhando-se ao selvagem.

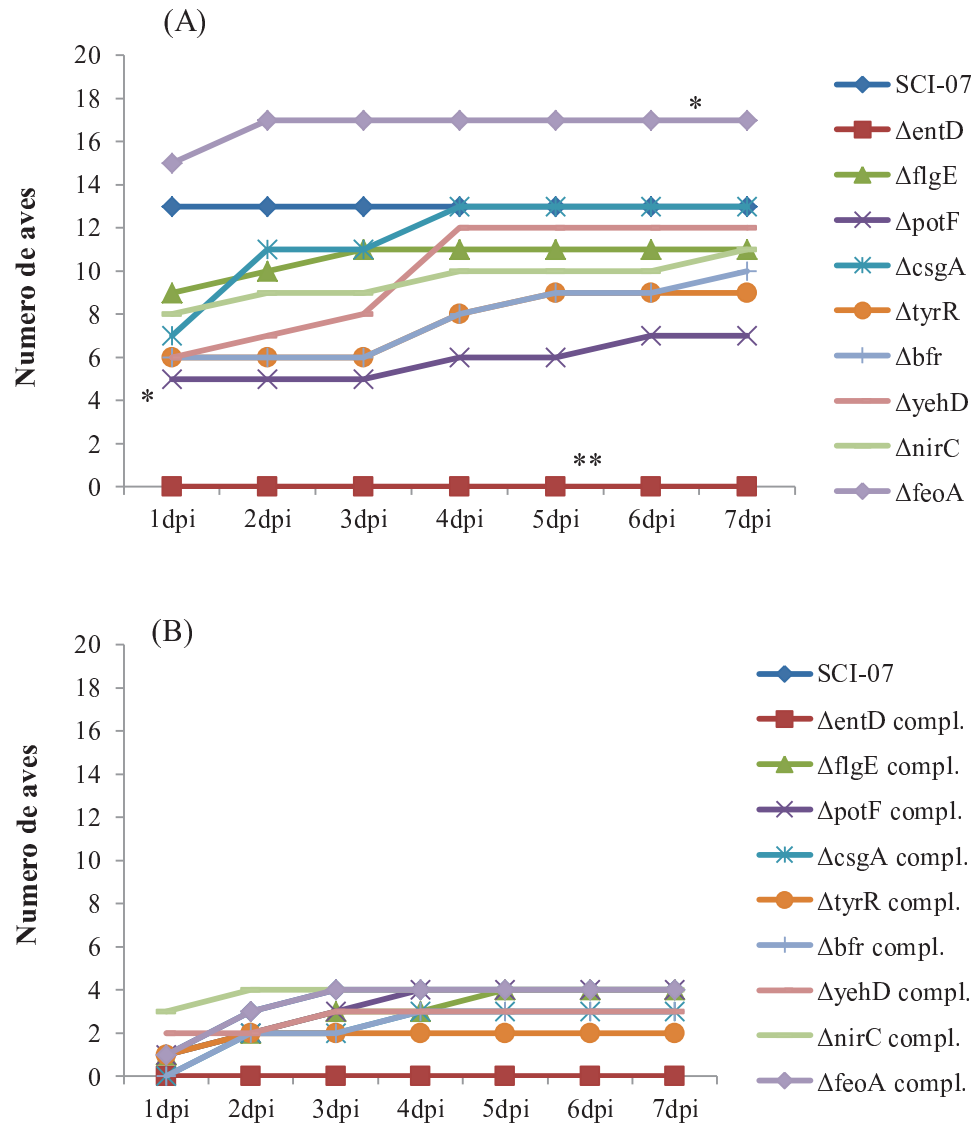


Figura 20. Mortalidade cumulativa em dias pós-infecção (dpi) de aves infectadas pela via do saco aéreo torácico direito. A) Mortalidade acarretada pelas linhagens mutantes em comparação à selvagem. Diferença estatística determinada pelo teste de Qui-Quadrado comparando os mutantes com a linhagem selvagem (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). B) Mortalidade acarretada pelas linhagens complementadas em comparação à selvagem.

6.8. Relação do gene *nirC* com a sobrevivência intra-macrofágica

O mutante $\Delta nirC$ apresentou uma melhor sobrevivência dentro dos macrófagos de aves (HD-11) que a linhagem selvagem após 16 horas de infecção, mas equivalente à selvagem após 3 horas (Figura 19A). Com o intuito de entender a relação entre a deleção de *nirC* e a maior sobrevivência do mutante em macrófagos, realizamos um ensaio de PCR em tempo real utilizando o RNA total do ensaio de 16 horas de sobrevivência em células HD-11. A expressão do regulador NsrR, o qual regula a expressão da flavohemoglobina Hmp e YteE, e também as expressões destes mesmos genes foram avaliados na linhagem $\Delta nirC$ em comparação à selvagem. Estes três genes estão relacionados ao mecanismo de sobrevivência ao estresse oxidativo acarretado pelo óxido nítrico proveniente da atividade antibacteriana dos macrófagos.

Nós verificamos que a expressão do regulador NsrR estava fortemente aumentada e a expressão de *hmp* e *yteE* era duas vezes maior na linhagem mutante $\Delta nirC$ em comparação à linhagem selvagem, indicando portanto, que a deleção do gene *nirC* tornou a bactéria mais hábil a sobreviver à ação bactericida dos macrófagos em um mecanismo relacionado ao regulador NsrR.

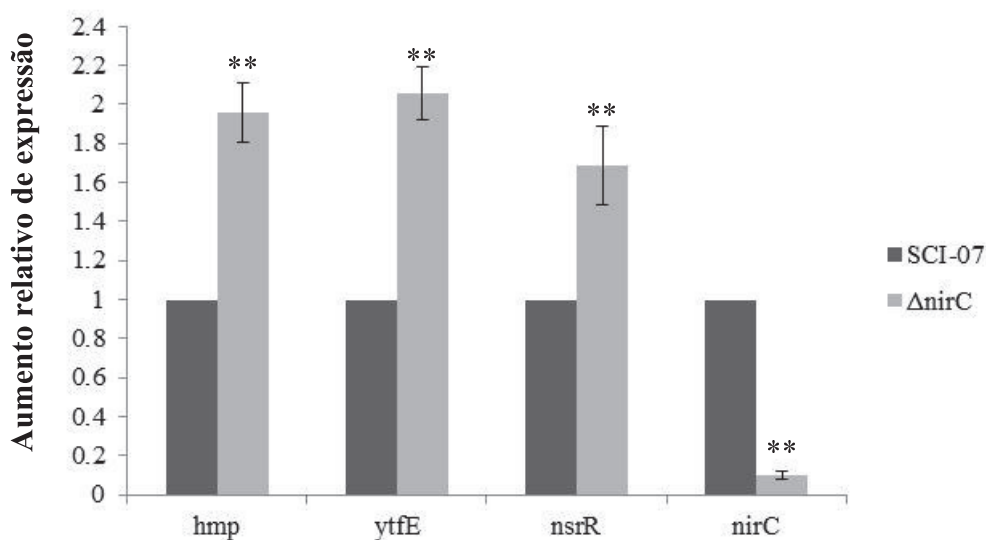


Figura 21. Análise da expressão gênica de genes relacionados à sobrevivência das linhagens SCI-07 e $\Delta nirC$ em macrófagos aviários após 16 horas de infecção. Diferença estatística determinada pelo teste de Tukey em comparação à linhagem selvagem (** $p < 0,01$).

6.9. Curva de crescimento do mutante atenuado

Com o intuito de descartar qualquer influência da taxa de crescimento da linhagem $\Delta entD$ com sua atenuação, uma curva de crescimento foi realizada, obtendo-se a medida de crescimento através da leitura da densidade ótica em 600nm a cada meia hora, durante oito horas. Verificamos que não há nenhuma deficiência de crescimento por parte do mutante atenuado $\Delta entD$, o que sugere que atenuação está relacionada com alteração direta nas propriedades de virulência da linhagem.

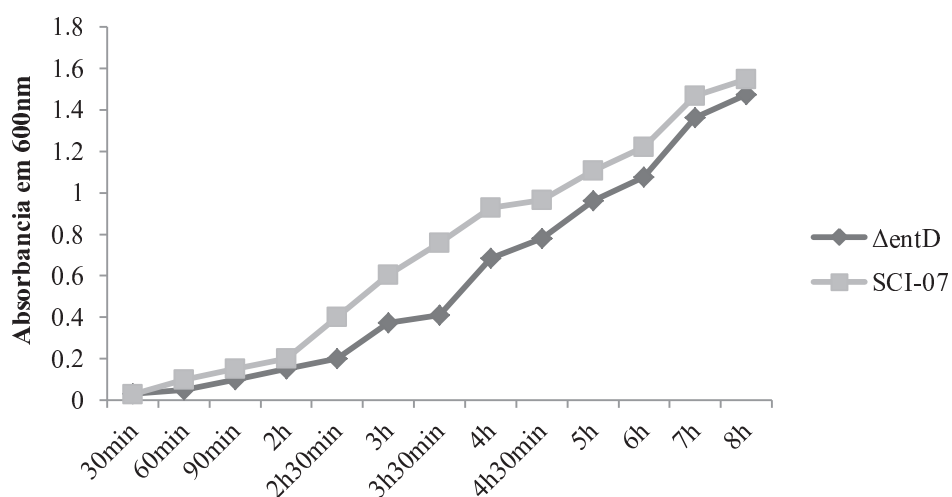


Figura 22. Curva de crescimento comparando a linhagem atenuada SCI-07 ao mutante atenuado $\Delta entD$.

7. Discussão

Escherichia coli patogênica para aves (APEC) está tipicamente associada com doenças extra-intestinais, principalmente infecções respiratórias ou sistêmicas, coletivamente conhecidas como colibacilose (Gross, 1991). Fatores associados, ou responsáveis pela doença, bem como os mecanismos responsáveis pela persistência da bactéria nas aves permanecem pouco entendidos. Além disso, o conhecimento a respeito da fisiologia e metabolismo bacteriano é considerado como pré-requisito para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade (Cole, 2012).

Este trabalho é embasado em um Microarranjo da linhagem APEC SCI-07, realizado *in vitro*, o qual revelou uma série de genes super-expressos na linhagem em questão comparados à linhagem padrão EHEC 8624. Nove destes genes foram assumidos como sendo, possivelmente, importantes para patogenicidade de APEC (*yehD*, *flgE*, *potF*, *csgA*, *tyrR*, *nirC*, *bfr*, *entD* e *feoA*) e então deletados para que os mutantes fossem avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto as suas respectivas contribuições na virulência da linhagem SCI-07.

7.1. Contribuição dos genes *csgA* e *yehD* na patogenia da linhagem SCI-07

A capacidade bacteriana de aderir a tipos celulares e tecidos é, sabidamente, um pré-requisito para colonização e patogênese. As bactérias ligam-se especificamente a superfícies do epitélio e de mucosas, frequentemente por estruturas fimbriais (Mims *et al.*, 1995). Linhagens APEC, comumente, expressam fimbrias do tipo 1, P e “curli” e possuem flagelos peritríqueos os quais conferem motilidade e que também podem servir, em alguns casos, como adesinas. A fimbria do tipo 1 confere adesão e hemaglutinação manose sensível, sendo expressa, preferencialmente, no trato respiratório das aves (La Ragione *et al.*, 2000a). Estas fimbrias são encontradas em linhagens de APEC com frequência de 70 a 100% (Janssen *et al.*, 2001; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Knöbl *et al.*, 2006).

Algumas linhagens APEC também elaboram fimbrias P, as quais medeiam adesão e aglutinação manose resistente e são consideradas essenciais para a virulência de linhagens de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) (Johnson, 1991). Um estudo da prevalência dos genes para fimbria P (genes *pap*) em APEC, mostrou que 76% dos 1601 isolados perderam o “operon” *pap* (Stordeur *et al.*, 2002), indicando que esta fimbria não apresenta alta prevalência em APEC. Nossa

linhagem em estudo a SCI-07 também não apresenta os genes codificadores da fimbria P. Ambas as fimbrias, P e tipo 1 causam aumento da resposta de citocinas produzidas por células epiteliais, com aumento da secreção de quimiocinas e recrutamento de neutrófilos *in vivo* (Godaly *et al.*, 1998; Hedges *et al.*, 1995).

Fimbrias “curli” são estruturas encaracolas, codificadas pelo “operon” *csgAB*, descritas por Olsen *et al.* (1989) encontradas na maioria das linhagens de *E. coli*, incluindo linhagens não patogênicas. Fimbrias “curli” têm função na colonização tecidual, devido a suas habilidades de se ligar às fibronectina, plasmina e ao plasminogênio (Hammar *et al.*, 1995). Muitos trabalhos demonstraram que em *E. coli* e *Salmonella* as fimbrias “curli” estão associadas à adesão a tecidos de origem aviária e à persistência em aves infectadas com 1 dia de vida (La Ragione *et al.* 2000a), bem como demonstraram a habilidade da fimbria “curli” em se ligar ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC-I), com proteínas séricas, matriz extra-celular (Herwald *et al.*, 1998; Olsen *et al.*, 1993), células intestinais de aves (La Ragione *et al.*, 2000b) e eritrócitos (Brown *et al.*, 2001), sugerindo a contribuição desta fimbria para a infecção do hospedeiro por APEC. No entanto, apesar destes dados experimentais, muito pouco de prático e concreto é sabido sobre o papel da fimbria “curli” na colibacilose aviária.

Neste trabalho, verificamos que a mortalidade acumulada causada pelo mutante $\Delta csgA$ (subunidade principal da curlina) em aves de um dia de vida foi similar à causada pela linhagem selvagem SCI-07, ainda que, inicialmente, o mutante $\Delta csgA$ tenha causado menor mortalidade. O perfil de motilidade do mutante $\Delta csgA$ mostrou-se triplicado em comparação ao selvagem ($p<0,01$), sugerindo que a deleção do gene *csgA* é benéfica à motilidade, o que sugere uma possível co-regulação da expressão de flagelos e fimbrias “curli”. Nenhuma diferença foi verificada entre o número de bactérias $\Delta csgA$ e SCI-07 que sobreviveram em macrófagos aviários (HD-11) ou invadiram fibroblastos (CEC-32). Considerando os dados de adesão, o mutante $\Delta csgA$ mostrou forte redução na capacidade de aderir a fibroblastos de aves (linhagem FEG), em comparação ao selvagem ($p<0,01$), em ambos os ensaios adotados: dependente e independente da fimbria do tipo 1 (por adição ou omissão do alfa-D-mannopiranoside), corroborando observações anteriores de que a fimbria “curli” é mediadora da adesão às células de origem aviária (La Ragione *et al.*, 2000a; 2000b). O número de bactérias $\Delta csgA$ que invadiram as células HEP-2 foi significativamente menor que o número de bactérias selvagens ($p<0,05$),

indicando que a redução na capacidade de invasão do mutante $\Delta csgA$, neste tipo celular, se deva, possivelmente, à redução na sua capacidade de adesão.

Nossos resultados estão em concordância com observações anteriores de estudos *in vitro* os quais mostram a particular importância da fimbria “curli” em mediar a adesão e a persistência de APEC em tecidos do epitélio gastro-intestinal (La Ragione *et al.*, 2000a) e em aumentar a colonização bacteriana na superfície de células epiteliais (Collinson *et al.*, 1993). Os resultados de Mellata *et al.* (2003) demonstram que, embora a fimbria “curli” se ligue a proteínas séricas, essa não contribui significativamente para a resistência ao soro, uma vez que a inativação do gene *csgA* não afetou a resistência ao soro da linhagem APEC $\chi 7122$ e, tampouco alterou sua capacidade em causar lesões e colonizar os órgãos das aves.

A linhagem mutante $\Delta yehD$ (possível adesina fimbrial) mostrou a mesma habilidade da linhagem selvagem SCI-07 em causar mortalidade em aves de 1 dia de vida. Também não foram verificadas diferenças quanto à capacidade de adesão em fibroblastos (FEG) e ao número de bactérias viáveis recuperadas da infecção de macrófagos de aves (HD11), de fibroblastos (CEC-32) e de células HEP-2. Verificou-se apenas um discreto aumento na motilidade do mutante $\Delta yehD$.

Coletivamente, estes resultados sugerem que, ao contrário da fimbria “curli”, a presença do gene *yehD* não exerce um papel significativo na virulência da linhagem SCI-07, provavelmente porque esta linhagem possui muitas outras possíveis fimbrias no genoma, tais como APEC078_11260 (putative fimbrial-like adhesin exported protein), YadC, YehA, StcD (ncbi/SCI-07shotgun genome, número de acesso CP000468.1) além das fimbrias tipo 1 e “curli”, as quais, possivelmente, são responsáveis pela adesão observada na linhagem $\Delta yehD$.

7.2. Contribuição do gene *flgE* na patogenia da linhagem SCI-07

A maioria das bactérias pode se mover através de ambientes líquidos, ou superfícies semi-sólidas, através do movimento controlado de rotação de estruturas extracelulares, os flagelos. Bactérias acessam ambientes mais favoráveis ou retiram-se de ambientes não favoráveis através da motilidade proporcionada pelos flagelos (Lee & Hughes, 2006). A expressão flagelar é regulada temporalmente e a biossíntese flagelar segue um ordenado processo hierárquico de montagem (Karlinsky *et al.*, 2000). Cada flagelo é composto por três partes distintas: corpo basal,

gancho e filamento (Aizawa, 1996). O gancho flagelar corresponde a uma estrutura curvada que se estende do corpo basal, sendo composto primariamente pela proteína FlgE. As proteínas FlgK e FlgD constituem a junção gancho-filamento.

O mutante imóvel $\Delta flgE$ não mostrou nenhuma diferença na habilidade de causar mortalidade em aves de 1 dia de vida, na capacidade de aderir à células FEG bem como na capacidade de invadir fibroblastos da linhagem CEC-32, em comparação à linhagem selvagem. No entanto, o mutante $\Delta flgE$ apresentou redução na capacidade de sobreviver em macrófagos aviários ($p < 0,05$) e uma redução não significativa no número de bactérias viáveis $\Delta flgE$ recuperados das células Hep-2 comparados ao selvagem foi observado.

Embora o flagelo seja considerado uma estrutura relacionada à virulência em APEC, previamente registrado mediando a penetração no muco que recobre as células epiteliais (Smyth, 1988), contribuindo para adesão em células epiteliais *in vitro* (La Ragione *et al.*, 2000a; Allen-Vercoe & Woodward, 1999), favorecendo a persistência no intestino das aves (La Ragione *et al.*, 2000b) e promovendo sobrevivência intracelular de *E. coli* (Parkinson *et al.*, 1983) e *Salmonella* (Weinstein *et al.*, 1984; Khoramian-Falsafi *et al.*, 1990), nossos resultados na linhagem SCI-07 mostram que a deleção do gene *flgE* não alterou significativamente a patogenicidade da linhagem estudada. Ainda que a diminuição da capacidade do mutante em sobreviver no interior de macrófagos favoreça a eliminação da bactéria pelo sistema imune, não se pode assumir que houve uma atenuação *in vivo* da linhagem $\Delta flgE$. De certo modo, estes resultados são compreensíveis, uma vez que considerável porcentagem de linhagens de *E. coli* causadoras de colisepticemia em aves são imóveis, corroborando afirmações anteriores de que a motilidade não é essencial para completa virulência de APEC (McPeake *et al.*, 2005).

7.3. Contribuição do gene *potF* na patogenia da linhagem SCI-07

Poliaminas são aminas alifáticas amplamente distribuídas em procariotos e atuam como importantes fatores de crescimento, estabilizando a estrutura de ácidos nucleicos (van Dam *et al.*, 2002) e promovendo síntese de proteínas (Igarashi & Kashiwagi, 2006). De acordo com Schneider *et al.*, (2013) o catabolismo de poliaminas é parte central das respostas metabólicas ao estresse bacteriano. Poliaminas primárias são putrescina, espermidina e espermina. Em *E. coli*, putrescina estimula a tradução de inúmeros genes, incluindo numerosos fatores de transcrição, os

quais por sua vez, estimulam a transcrição de aproximadamente outros 300 genes (Yoshida *et al.*, 2004; Terui *et al.*, 2009). Putrescina pode ainda, ser usada como fonte única de nitrogênio (Tkachenko *et al.*, 1999).

A expressão de poliaminas, e a quantidade delas no interior das bactérias, são reguladas por seus processos de biossíntese, degradação, captação e excreção (Casero & Pegg 2009; Igarashi *et al.*, 2010). *E. coli* depende de ambos, da captação e da síntese para manter os níveis intracelulares ótimos de poliaminas. Seis importadores de putrescina já foram identificados em *E. coli*: PotFGHI, PotABCD, PotE, PuuP, YdeSTUV e PlaP (Kurihara *et al.*, 2009). A captação de putrescina por PotFGHI, ao qual pertence a família de transportadores conhecidas como ABC (Pistocchi *et al.*, 1993) é dependente de energia proveniente de ATP e da formação de um potencial de membrana (Terui *et al.*, 2013).

O mutante SCI-07 $\Delta potF$ apresentou atenuação parcial da patogenicidade, uma vez que a habilidade de causar mortalidade inicial nas aves foi inferior àquela do selvagem ($p < 0,05$). A motilidade do mutante $\Delta potF$ foi similar à da linhagem selvagem. As capacidades de invasão e de sobrevivência intracelular do mutante $\Delta potF$ não foram alteradas em nenhum dos tipos celulares utilizados nos ensaios (HD-11, CEC-32 e Hep-2). Provavelmente, o mecanismo de atenuação *in vivo* não está associado à capacidade de sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos.

O número de bactérias $\Delta potF$ aderidas às células FEG foi inferior ao número de bactérias selvagens, quando na ausência de alfa-D-manopiranosose ($p < 0,05$), o que sugere um efeito negativo da deleção de *potF* na adesão mediada pela fimbria do tipo 1. Associações entre a captação de poliaminas e a adesão mediada pela fimbria do tipo 1 já foram previamente relatadas em *E. coli* K-12, reforçando nossas observações (Kurihara *et al.*, 2011). A atenuação de mutantes para genes transportadores de poliaminas também foi verificada por Ware *et al.*, (2006), neste trabalho a deleção do gene *potD* em pneumococos acarretou marcada diminuição da patogenicidade da bactéria, em ambos os modelos de doença avaliados: septicemia e pneumonia. Outros estudos mostram que a putrescina restaura a expressão de genes de virulência em *Shigella flexneri* (Durand *et al.*, 2003), influencia a formação dos filamentos necessários para a virulência em *Candida albicans* (Herrero *et al.*, 1999) e está envolvida com a adesão celular de *Trichomonas vaginalis* (Garcia *et al.*, 2005), como verificado neste trabalho. Poliaminas, em geral, desempenham papel na virulência de outros patógenos intracelulares, incluindo *Francisella*

tularensis e *Legionella pneumophila* (Durand & Bjork, 2003; Russo *et al.*, 2011; Carlson *et al.*, 2009; Nasrallah *et al.*, 2011). Dados de super-expressão de poliaminas em transcriptomas, semelhantes ao microarranjo que embasaram este trabalho, também são verificados na literatura. Um transcriptoma de *S. Typhimurium* mostrou super-expressão de genes para captação de putrescina e espermidina durante a infecção de células epiteliais e macrófagos (Eriksson *et al.*, 2003; Jelsbak *et al.*, 2012).

Mutantes de *S. Typhimurium* para a síntese e transporte de putrescina apresentaram deficiência na invasão de células epiteliais, redução na sobrevivência e multiplicação intracelular e atenuação no modelo murino de febre tifoide em comparação ao selvagem (Jelsbak *et al.*, 2012).

Estudos têm mostrado, ainda, o papel das poliaminas no processo de sinalização celular bacteriana do tipo “quorum sensing”. Quando as poliaminas são utilizadas como moléculas sinalizadoras, há necessidade por parte das bactérias, de dispor de sensores e transportadores de membrana para a captação destas poliaminas extracelulares uma vez que não há transporte passivo destas moléculas. *E. coli* utiliza a putrescina como molécula sinalizadora para sentir a densidade celular, de forma que a concentração de putrescina no ambiente é mantida pela população de bactérias em níveis proporcionais à curva de crescimento (Schiller *et al.*, 2000). Além da informação de densidade populacional, as putrescinas quando utilizadas como sinalizadores ambientais promovem, ainda, alteração na expressão gênica, modulando virulência e adaptação ao hospedeiro em bactérias de um mesmo nicho (Sturgill & Rather, 2004; Zhou *et al.*, 2007; Carlson *et al.*, 2009; Russo *et al.*, 2011; Jelsbak *et al.*, 2012). Neste contexto, receptores e transportadores de putrescina, tais como PotF, parecem essenciais ao processo de sinalização, podendo-se sugerir que este fato seja o responsável pela atenuação parcial observada na linhagem SCI-07 Δ potF.

7.4. Contribuição do gene *tyrR* na patogenia da linhagem SCI-07

O gene *tyrR* é responsável pela síntese de um regulador transcricional de genes associados ao metabolismo de aminoácidos aromáticos. Em *E. coli*, a proteína TyrR regula a expressão de ao menos 8 genes responsáveis pela biossíntese e transporte de aminoácidos aromáticos: *aroF*, *aroL*, *tyrP*, *tyrB*, *tyrR mtr*, *aroP*, *aroG* e de *folA* que exerce função na síntese

de glicina, metionina e purinas (Pittard *et al.*, 2005). TyrR em *E. coli* pode atuar como repressor ou indutor de transcrição, interagindo com os 3 aminoácidos aromáticos: tirosina, fenilalanina e triptofano no mecanismo de regulação positiva, no entanto, ainda não se descreveu o mecanismo comum de regulação negativa (repressão) da proteína TyrR (Pittard *et al.*, 2005). TyrR é considerado um regulador ímpar, pois é hábil em interagir com múltiplos cofatores, fato incomum entre os reguladores, e exercer ampla gama de efeitos regulatórios através de um mecanismo de formação de diferentes estruturas oligoméricas no DNA, estas estruturas permitem ao regulador entrar em contato com algumas outras proteínas regulatórias, ativando ou reprimindo a transcrição gênica.

O mutante SCI-07 $\Delta tyrR$ apresentou menor capacidade de causar mortalidade cumulativa (35%) que a linhagem selvagem (65%) ($p < 0,05$) durante os sete dias avaliados, o que indica uma atenuação parcial. A deleção do gene *tyrR* acarretou diminuição de motilidade ($p < 0,05$) e redução na habilidade de sobreviver dentro dos macrófagos aviários ($p < 0,05$) quando comparado à linhagem selvagem. A capacidade de adesão do mutante $\Delta tyrR$ em células FEG não foi afetada na presença, ou ausência, do alfa-D-manopiranosídeo. Considerando os ensaios de invasão, não houve diferença entre o número de bactérias mutantes e selvagem recuperadas das células CEC-32, enquanto um menor número de bactérias $\Delta tyrR$ foi recuperado das células Hep-2 em comparação à linhagem selvagem ($p < 0,05$).

Nenhum trabalho, até o momento, demonstrou o papel do gene *tyrR* nos mecanismos de patogenicidade de nenhuma espécie de bactéria patogênica. No entanto, a atenuação de mutantes para síntese de aminoácidos aromáticos (mutantes *aro*) é largamente conhecida em muitas espécies de bactérias (Sebkova *et al.*, 2008; Strikzer *et al.*, 2004) e, a maioria destes mutantes têm sido utilizados extensivamente por décadas como vacinas vivas, inclusive para a colibacilose (Hone *et al.*, 1991; La Ragione *et al.*, 2013). Dessa forma, podemos assumir que esses dados corroboram indiretamente a importância do “regulon” *tyrR* no processo patogênico, verificado em nosso trabalho.

A diminuição da motilidade, da capacidade de sobreviver em macrófagos de aves e a diminuição da patogenicidade final da linhagem SCI-07 $\Delta tyrR$ estariam possivelmente associadas às alterações previamente vislumbradas nos mutantes *aro*, as quais são consequência, da auxotrofia gerada pela incapacidade de biossíntese de aminoácidos aromáticos, ao menos em

primeira instância. Os resultados de Strikzer *et al.* (2004) assemelham-se muito aos nossos, neste trabalho, mutantes *aroE* de *Listeria monocytogenes* mostraram forte redução na capacidade de se multiplicar em células epiteliais, de se replicar no interior de monócitos e de colonizar fígado e baço de camundongos, estas alterações culminaram em forte redução na capacidade do mutante de causar mortalidade em camundongos.

Os mutantes de *Salmonella* Typhimurium *aroA*, *aroD* e *aroC* mostraram se sensíveis aos efeitos bactericidas do soro, e a razão desta sensibilidade foi atribuída a super-expressão do gene *murA*, o qual está relacionado à formação da parede bacteriana. A super-produção de mureína causou a desestruturação da parede, e neste caso, a atenuação das linhagens mutantes está relacionada não à incapacidade da síntese de aminoácidos aromáticos, mas sim, ao defeito na parede bacteriana, que acarretou maior sensibilidade aos componentes de resposta imune inata (Sebkova *et al.*, 2008).

Embora todos estes dados sugiram a importância do gene *tyrR* na patogenicidade, por efeito indireto na síntese de aminoácidos aromáticos, experimentos extras, envolvendo a expressão destes mesmos genes, nas linhagens selvagem e mutante, se fazem necessários e encontram-se em realização.

7.5. Contribuição do gene *nirC* na patogenia da linhagem SCI-07.

E. coli e *Salmonella* têm duas vias independentes de redução de nitrato e nitrito, uma localizada no periplasma, e outra no citoplasma (Page *et al.*, 1990). Nitrito (NO_2^-) é o ponto central no metabolismo de Nitrogênio em bactérias (Einsle & Kroneck, 2004) sendo, ainda, utilizado como citotoxina por macrófagos como parte da resposta imune inata (Xie & Nathan, 1994). Ânions NO_2^- são gerados pela redução do nitrato quando estes são utilizados como aceptores finais de elétrons, durante a respiração anaeróbia (Showe & DeMoss 1968), o próprio NO_2^- pode, ainda, ser utilizado comoceptor final de elétrons por nitrito redutases que o reduzem ao íon amônio (Showe & DeMoss 1968). No entanto, NO_2^- não pode ser acumulado no interior das bactérias, uma vez que este se converte espontaneamente no altamente danoso óxido nítrico (NO), quando em solução aquosa (Kharitonov *et al.*, 1994).

Diferentemente do NO que se difunde passivamente pela membrana citoplasmática, o nitrito requer transportadores específicos. NirC é o principal transportador de nitrito em *E. coli* e

Salmonella, sendo necessário em *Salmonella* Typhimurium (STM) para completa virulência deste patógeno no modelo murino de febre tifóide (Das *et al.*, 2009). O gene *nirC* de STM partilha uma complexa relação com a Ilha de Patogenicidade 2 (SPI2) onde *nirC* garante a sobrevivência de STM dentro do fagossoma do macrófago através da captação do NO_2^-/NO produzido pelo macrófago hospedeiro e o posterior desligamento da produção de NO por parte do macrófago. O mutante STM $\Delta nirC$ mostrou-se atenuado para camundongos, incapaz de transportar NO_2^- e a deleção do gene *nirC* acarretou alta expressão de Oxido Nitrico Sintases (iNOS) por parte dos macrófagos hospedeiros (Das *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostraram-se divergentes dos visualizados em STM. O mutante SCI-07 $\Delta nirC$ mostrou mortalidade acumulada similar ao da linhagem selvagem. No entanto, a mortalidade causada pelo mutante foi crescente durante os 7 dias avaliados e não pontual como observado com frequência para linhagens APEC (Pace *et al.*, 2010, 2011), indicando uma demora por parte do sistema imune das aves em controlar a infecção. O número de bactérias $\Delta nirC$ recuperadas dos macrófagos foi semelhante ao selvagem após 3 horas de infecção mas superior a este após 16 horas de infecção ($p < 0,05$), indicando uma maior capacidade do mutante em sobreviver às ações bactericidas desempenhadas pelos macrófagos. A motilidade do mutante $\Delta nirC$ também mostrou-se superior à do selvagem ($p < 0,05$). Por outro lado, o número de bactérias $\Delta nirC$ aderidas às células FEG foi muito inferior ao do selvagem ($p < 0,01$), na presença e na ausência de alfa-D-manopiranoase, indicando que a deleção afetou a capacidade de adesão da linhagem SCI-07 de forma dependente e independente da fimbria do tipo 1. A habilidade de invasão em CEC-32 e Hep-2 não foram alteradas pela deleção.

Alguns estudos têm associado motilidade e formação de biofilme à proteína reguladora NsrR a qual medeia respostas adaptativas em *E. coli* e *Salmonella* durante o estresse nitrosativo, incluindo a regulação positiva dos genes chave do processo de detoxificação por NO: *hmp* (flavohemoglobina) e *ytfE* (iron-sulfur cluster repair di-iron proteína) (Constantinidou *et al.*, 2006; Mills *et al.*, 2001). Hmp é a enzima chave no processo detoxificação celular por NO em aerobiose e anaerobiose e, assim como o “regulon” NsrR regula a motilidade bacteriana na presença de NO. Com o intuito de comprovar que a maior motilidade e a maior capacidade de sobrevivência do mutante $\Delta nirC$ dentro de macrófagos seria consequência da maior expressão dos genes *nsrR*, *hmp* e *ytfE*, a expressão destes foi verificada na linhagem mutante em

comparação à selvagem. Encontramos expressões muito aumentadas na linhagem mutante $\Delta nirC$ nos três genes avaliados, comprovando nossa hipótese. Estes genes são importantes para STM durante os estágios tardios da infecção de macrófagos *in vitro* e desenvolvimento da febre tifoide, quando a produção de NO está aumentada (Mastroeni *et al.*, 2000; Vazquez-Torres *et al.*, 2000; Vazques-Torres & Fang, 2001). Estas observações podem explicar o comportamento do mutante *nirC*, o qual apresenta comportamento divergente considerando o estágio inicial de infecção e estágios mais tardios como o aumento da capacidade de sobreviver aos macrófagos apenas com 16 horas de infecção.

7.6. Contribuição do gene *bfr* na patogenia da linhagem SCI-07

A habilidade das linhagens APEC de sequestrar ferro (Fe), a partir do sangue e tecidos de aves, é considerada um ponto crítico para a virulência destas linhagens. Um grande número de mecanismos de aquisição de ferro tem sido descritos em APEC (Dho & Lafont, 1984; Kammler *et al.*, 1993; Grass, 2006; Johnson *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2013). Embora o ferro seja um elemento essencial para muitos micro-organismos, atuando em incontáveis processos biológicos, a disponibilidade biológica de Fe é extremamente limitada. Além disso, o Fe é potencialmente tóxico, devido à sua habilidade em gerar o mais tóxico de todas as espécies reativas de oxigênio (ROS), o ion hidroxila $OH^\cdot$. Ferritinas podem, de forma reversiva, sequestrar Fe na forma mineral e mobilizá-lo para uso intracelular quando o suprimento deste se torna limitante, ao mesmo tempo em que minimizam a toxicidade causada pelo Fe (Velayudhan, *et al.*, 2007). Três tipos de ferritinas têm sido caracterizados em bactérias: FtnA a qual também é encontrada em eucariotos, bacterioferritina (Bfr), encontrada exclusivamente em bactérias e Proteína de Ligação ao DNA (DPS), a qual está presente em archaea e bactérias. Muito pouco é conhecido a respeito da mobilização do Fe pelas ferritinas para o uso intracelular, mas presume-se que este processo seja mediado pela redução do Fe_3^{+} no “core” das ferritinas.

A função primária das ferritinas é o estoque de Fe e a detoxificação. No entanto, há uma significativa variação na função e regulação das ferritinas nas diferentes espécies bacterianas que crescem em condições limitantes de Fe, e muito pouco tem sido investigado a respeito do papel das ferritinas em *E. coli* (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999).

A linhagem mutante SCI-07 Δbfr deste estudo não apresentou alteração na capacidade de causar mortalidade em aves de 1 dia, bem como não alterou suas capacidades de sobreviver nos macrófagos de aves e invadir células Hep-2 quando comparada à linhagem selvagem. Por outro lado, o mutante Δbfr apresentou maior motilidade ($p < 0,01$) e uma forte redução na adesão em fibroblastos, na presença e ausência de alfa-D-manopiranosídeo ($p < 0,01$). Nossos resultados são muito similares aos apresentados por Velayudhan *et al.* (2007) em *Salmonella* Typhimurium (STM) e Denoel *et al.* (1997) em *Brucella melitensis*. No primeiro trabalho, o mutante de STM Δbfr apresentou apenas alterações nas propriedades avaliadas em análises *in vitro*, isto é, a deleção do gene *bfr* elevou a concentração *in vitro* do Fe extracelular no meio de cultivo e aumentou a susceptibilidade da bactéria ao estresse oxidativo causado por H_2O_2 (*in vitro*). No entanto, não houve alteração na taxa de sobrevivência de camundongos desafiados com a linhagem mutante Δbfr e a linhagem selvagem, além de não ter ocorrido diferença no número de bactérias mutante e selvagem recuperadas dos órgãos dos animais.

O mutante Δbfr de *Brucella* mostrou a mesma capacidade da linhagem selvagem em invadir e em sobreviver no interior de monócitos humanos, estes resultados sugerem que *Bfr* não é essencial para a sobrevivência intracelular de *B. melitensis* em monócitos humanos, ainda que a proteína Bfr seja um dos principais antígenos utilizados no diagnóstico da brucelose (Denoel *et al.*, 1998; Al-Mariri *et al.*, 2001).

Se considerarmos o patógeno humano *Neisseria gonorrhoeae*, podemos verificar trabalhos nos quais Bfr mostrou ser importante fonte de Fe durante momentos de privação do íon, e ainda, conferindo proteção contra o estresse oxidativo, condições estas avaliadas *in vitro* (Chen & Morse, 1999).

Em *Bacterioides fragilis*, Bfr está incluído entre os fatores *in vitro* que contribuem para resistência ao estresse oxidativo e a aerotolerância deste patógeno gastro-intestinal humano (Gaus *et al.*, 2012).

As razões por trás destes comportamentos divergentes em relação ao papel do gene *bfr* nas diferentes espécies bacterianas podem estar associadas às observações de Tehrani *et al.*, (1999), em *E. coli*, e Veluydan *et al.* (2007), em *Salmonella* Typhimurium. Ambos os trabalhos indicam que falhas fenotípicas no armazenamento de Fe são mais evidentes quando as bactérias

estão na fase estacionária de crescimento e em meio rico em ferro. Somada a isso, a provável razão para a não alteração no perfil de virulência de *S. Typhimurium* Δbfr , *B. melitensis* Δbfr , e SCI-07 Δbfr está na co-existência de múltiplas ferritinas dentro da *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Vibrio cholera* (Andrews, 1998) e *Bacterioides fragilis* (Gauss *et al.*, 2012) o que sugere que elas cumprem papéis fisiológicos diferentes e/ou que são expressas em condições diferentes nas diferentes espécies. Enquanto em *E. coli*, FtnA realiza a maior contribuição na capacidade de armazenar ferro, em *Salmonella* esta função é desempenhada por Bfr (Velayudhan *et al.*, 2007). O gene Dps, por sua vez, é o mais induzido em *E. coli* em resposta ao estresse por H_2O_2 , mas não é importante para o armazenamento de Fe (Zheng *et al.*, 2001). Por fim, as razões por trás da diminuição da adesão na linhagem SCI-07 Δbfr são interessantes e necessitam de futuras investigações.

7.7. Contribuição dos genes *feoA* e *entD* na patogenia da linhagem SCI-07

Como já discutido, o ferro é um elemento essencial para todos os micro-organismos. A habilidade de adquirir quantidade suficiente de ferro do ambiente é vital para a maioria das bactérias. Isto é particularmente verdade para bactérias patogênicas que devem competir com os mecanismos de remoção do ferro disponível, realizado pelo hospedeiro como forma de defesa (Cartron *et al.*, 2006; Grass, 2006). Frequentemente, múltiplos sistemas de obtenção de ferro estão disponíveis nas espécies bacterianas promovendo o alcance das várias formas de ferro do ambiente com especificidade e afinidade. Dentre eles destacam-se os complexos sideróforos, grupos heme, complexos heme-proteínas, complexos transferrinas e ferro-citrato (Cartron *et al.*, 2006). Em Gram-negativas, transportadores de ferro, geralmente, consistem de um receptor de membrana externa TonB-dependente, uma proteína de ligação periplasmática, e uma permease de membrana interna do tipo transportador-ABC (Cartron *et al.*, 2006).

O ion ferroso (Fe_2^+) pode ser considerado a forma preferida de ferro a ser utilizada pelas bactérias uma vez que é relativamente solúvel o que permite o transporte direto deste metal. No entanto Fe_2^+ predomina sobre a forma do íon férrico (Fe_3^+) apenas em ambiente redutor (anaerobiose), ou em baixo pH.

Fe_3^+ é praticamente insolúvel em pH neutro e muitos micro-organismos secretam sideróforos, compostos quelantes de Fe_3^+ de alta afinidade para obtê-lo, sendo esta a forma predominante do ferro em aerobiose.

Pouco se conhece sobre a captação do Fe_2^+ , embora alguns micro-organismos usem principalmente ou exclusivamente Fe_2^+ para o suprimento de ferro como, por exemplo, o *Bifidumbacterium* (Bezkorovainy, *et al.*, 1987). No patógeno intracelular *Legionella pneumophila* nenhum sideróforo foi identificado, até o momento, e assume-se que Fe_3^+ é reduzido a Fe_2^+ para que este possa ser usado como fonte de ferro por esta bactéria (Johnson, *et al.*, 1991). O patógeno humano *Streptococcus mutans* é outro exemplo de bactéria que utiliza apenas Fe_2^+ fornecido por redutases da superfície celular. Todas estas bactérias vivem em ambiente restrito em oxigênio onde Fe_2^+ está disponível. *E. coli* é anaeróbia facultativa, de forma que possui o sistema de transporte de Fe_2^+ conhecido como *feo*. FeoA é uma pequena proteína solúvel localizada no citosol, FeoB é uma proteína maior, com domínios citosólicos e de membrana interna, atuando como permease, FeoC é uma pequena proteína com função e estrutura ainda não elucidadas (Cartron *et al.*, 1996). Proteínas Feo tem importante papel na captação de Fe_2^+ em condições anaeróbias e microaerófilas, condições estas encontradas principalmente no trato gastro-entérico e no interior de tecidos e na corrente sanguínea.

O transporte de Fe_2^+ em *E. coli* ocorre aerobicamente e anaerobicamente mas é induzido apenas em anaerobiose. Mutantes Δfeo de *E. coli* K-12 são, sabidamente, defectivos na importação de Fe_2^+ (Cartron *et al.*, 2006). A deleção de *feoB* elimina o transporte de Fe_2^+ pela bactéria, enquanto a deleção de *feoA* diminui apenas 25% da captação (Kammler *et al.*, 1993). Estes resultados sugerem que FeoB tem um papel maior na captação de Fe_2^+ que FeoA. Provavelmente, por este fato, a literatura especializada carece de estudos utilizando mutantes $\Delta feoA$ de bactérias, mas é abundante em dados utilizando mutantes $\Delta feoB$.

Através de mutantes $\Delta feoB$, de *C. jejuni*, descobriu-se que FeoB exerce papel essencial na aquisição de ferro, colonização e sobrevivência da bactéria no trato entérico, no modelo de alça ligada em coelho, na colonização do ceco e no desencadeamento da infecção do trato intestinal das aves (Naikare *et al.*, 2006). Mutantes de *Salmonella* para *feoB* mostraram-se atenuados quanto à habilidade em colonizar o intestino de camundongos, provavelmente pela incapacidade de transportar Fe_2^+ (Stojiljkovic *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996). Por outro lado, o papel de Feo

na infecção sistêmica de *Salmonella* é contrastante, a deleção de *feoB* não afeta o potencial de infecção sistêmica (Tsolis *et al.*, 1996), bem como, não afeta a sobrevivência da bactéria em macrófagos (Boyer *et al.*, 2002). Em *H. pylori*, FeoB parece prover a principal rota de captação de ferro, sendo requerido para colonização da mucosa gástrica de camundongos, bem como para o crescimento normal da bactéria em condições limitantes em ferro (Velayudhan *et al.*, 2000). Em *Shigella flexneri*, a deleção de *feoB* tem impacto muito pequeno no desenvolvimento da bactéria em células Hela (Runyen-Janeckyn *et al.*, 2003). FeoB é, ainda, requerido para sobrevivência intracelular de *Legionella pneumophila* (Robey & Cianciotto 2002) e para a virulência completa de *P. gingivalis* (Dashper *et al.*, 2005).

A aquisição de ferro por sideróforos é muito mais eficiente e, por isso, há maior variedade destes sistemas de obtenção de ferro em enterobactérias, em geral. Quatro diferentes sideróforos são conhecidos em *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC): enterobactina, salmoquelina, yersiniabactina e aerobactina (Gao *et al.*, 2012). Estes sistemas de transporte partilham estrutura comum e, os três primeiros derivam de um mesmo precursor o 4'fosfopanteteinil transferase (PPTase) codificado pelo gene *entD* (Martin *et al.*, 2013). Em *E. coli* a PPTase EntD é envolvida na síntese de enterobactina e salmoquelina. Um dos mais efetivos compostos quelantes de ferro é o sideróforo enterobactina (Pollack & Neilands 1970), a salmoquelina, no entanto, é considerado um fator de virulência mais potente por ter maior habilidade em evadir o sistema imune inato de mamíferos (Goetz *et al.*, 2002). O outro sideróforo que necessita de PPTase é a yersiniabactina codificada na Ilha de Alta Patogenicidade (HPI) (Schubert *et al.*, 2002) de ExPEC.

O trabalho de Martin *et al.* (2013) evidenciou, pela primeira vez, o papel das PPTases como promissores alvos para o desenvolvimento de drogas antibacterianas, uma vez que estas enzimas são cruciais para a biossíntese de uma série de metabólitos e fatores de virulência.

Neste trabalho, resultados obtidos com os mutantes SCI-07 Δ *feoA* e SCI-07 Δ *entD* apresentaram resultados divergentes, mas muito interessantes. O mutante Δ *feoA* mostrou-se hipervirulento, causando maior mortalidade em aves (90%) que a linhagem selvagem (65%) ($p < 0,05$), embora a motilidade, as capacidades de aderir às células FEG, invadir células CEC-32 e Hep-2 e sobreviver no interior dos macrófagos não tenham sido alteradas. O mutante *entD*, por sua vez, comportou-se nas aves de forma totalmente atenuada ($p < 0,01$), e à semelhança de

$\Delta feoA$, a deleção de *entD* não levou a alteração da motilidade ou das capacidades de aderir, invadir e sobreviver em cultivos celulares.

Nossos resultados poderiam ser, em parte, explicados pelo fato de que diferentes sistemas de captação de ferro são sabidamente requeridos de acordo com o tipo de doença causado, o tipo de órgão infectado ou, ainda, durante os diferentes estágios do processo de doença em uma mesma espécie bacteriana. Por exemplo, em *Bordetella pertussis* a expressão dos sideróforos alcaligina e enterobactina ocorrem inicialmente na infecção do pulmão, enquanto o sistema de transporte de Fe_2^+ atua de forma tardia na infecção (Brickman *et al.*, 2006, 2008). Em *Yersinia pestis*, o agente causal das pestes bulbônica e pneumônica, o sideróforo yersiniabactina é crítico para os estágios iniciais do desenvolvimento da doença, enquanto Yfe, transportador de Fe_2^+ é importante nos estágios finais do processo de infecção (Bearden *et al.*, 1997; Bearden & Perry, 1999). No entanto, o mutante $\Delta feoB$ de *Y. pestis* mostrou-se totalmente virulento tanto nos modelos de peste bulbônica quanto pneumônica (Fetherson *et al.*, 2012).

Cada sideróforo, por sua vez, tem afinidade específica por Fe_3^+ , sendo regulados de maneira diferencial, conferindo diferentes vantagens para ExPEC na adaptação aos diferentes ambientes e em evadir da resposta imune inata (Fischbach *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2012). Em APEC e UPEC, sabe-se que salmoquelina e aerobactina contribuem mais para virulência que transportadores heme de ferro, sendo a salmoquelina mais importante para virulência que a aerobactina (Gao *et al.*, 2012). Um mutante duplo de ExPEC, produtor apenas de aerobactina ($\Delta entD \Delta clbA$), foi completamente atenuado no modelo de sepse. No entanto, os mutantes individuais não mostraram atenuação (Martin *et al.*, 2013). Na linhagem APEC $\chi 7122$, o mutante sideróforo negativo ($\Delta entD \Delta iuc$) mostrou-se atenuado em tecidos e sangue, enquanto o mutante simples $\Delta entD$, o qual produz apenas aerobactina, manteve a virulência completa (Caza *et al.*, 2011).

Poderíamos, diante de nossos resultados e do apresentando na literatura, sugerir que a deleção de *feoA* causou super-expressão de outros transportadores de Fe_2^+ , presentes na linhagem em estudo tais como: MtnH, FeoB, FeoC e CorA, todos conhecidamente permeases envolvidos no transporte de Fe_2^+ (Grass, 2006) e que mais eficientes que FeoA aumentaram a virulência da bactéria ou, ainda, que a deleção de FeoA foi benéfica para algum ou alguns genes de virulência, aumentando dessa forma a virulência da linhagem SCI-07 $\Delta feoA$ para aves. Para o mutante *entD*,

de forma mais simplista, poderíamos sugerir que o gene *entD* é essencial para a virulência da linhagem SCI-07 e que sua ausência leva à atenuação do mutante para as aves. Para ambas as hipóteses, ensaios específicos precisam ser conduzidos com o intuito de se entender melhor as observações apresentadas aqui.

Tabela 6. Quadro resumo das alterações verificadas nas análises *in vitro* e *in vivo* dos nove mutantes da linhagem SCI-07 construídos neste trabalho.

Gene		Função	Alteração							Virulência em aves
			Motilidade	Adesão		Invasão		Sobrevivência em HD-11		
			Manose resistente	Manose sensível	CEC-32	Hep-2	3hpi	16hpi		
<i>csgA</i>	Estrutura fimbria curli	A	D	D	NA	D	NA	NA	NA	NA
<i>yehD</i>	Possível adesina fimbrial	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>flgE</i>	Estrutura flagelar	D	NA	NA	NA	NA	D	NA	NA	NA
<i>potF</i>	Captação de Putrescina	NA	NA	D	NA	NA	NA	NA	NA	D (parcialmente)
<i>tyrR</i>	Regulação da síntese de aminoácidos aromáticos	D	NA	NA	NA	D	D	NA	NA	D (parcialmente)

<i>nirC</i>	Transporte de nitrito	A	D	D	NA	NA	NA	NA	A	NA
<i>Bfr</i>	Armazenamento de Ferro e detoxificação celular	A	D	D	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>feoA</i>	Captção de Fe_2^+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	A
<i>entD</i>	Precursor da síntese de sideróforos	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	D (totalmente)

A: aumentado; D: diminuído; N/A: não alterado.

8. Conclusões

Pudemos verificar que todos os genes da linhagem SCI-07, com expressão aumentada no microarranjo, os quais foram selecionados para este trabalho, com exceção de *yehD*, mostraram-se relacionados a características tais como: capacidade de adesão e invasão de linhagens celulares cultivadas *in vitro*; capacidade de sobrevivência em macrófagos de aves e ao potencial patogênico em aves de um dia de idade, em diferentes níveis para cada mutante avaliado.

Nossos resultados destacam, ainda, a natureza multifatorial da patogênese de APEC, levando em conta que a expressão de genes de virulência é regulada por sistemas globais conservados que verificam e adaptam a bactéria às mudanças ambientais. Neste trabalho, nós demonstramos que a atenuação nem sempre é acompanhada pela diminuição na capacidade de adesão, invasão e sobrevivência em macrófagos, bem como, demonstramos que a diminuição na capacidade de adesão e invasão em APEC não significa a atenuação em aves. Nosso trabalho oferece uma contribuição na elucidação dos mecanismos de virulência de APEC e o desenvolvimento de ao menos três novos candidatos a linhagens vacinais e/ou linhagens carreadoras de epítomos presentes em outras linhagens APEC: SCI-07 Δ *potF*, SCI-07 Δ *tyrR* e SCI-07 Δ *entD*.

Finalmente, para os mutantes SCI-07 Δ *feoA*, SCI-07 Δ *entD* e SCI-07 Δ *tyrR* estudos adicionais são necessários para a melhor compreensão do mecanismo de ação de cada um dos genes citados no processo de patogênese da linhagem aqui estudada.

Referências

- ABDUL-TEHRANI, H.; HUDSON, A.J.; CHANG, Y.S.; TIMMS, A.R.; HAWKINS, C.; WILLIAMS, J.M. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 1415–1428, 1999.
- ABGOTTSPON, D.; RÖLLI, G.; HOSCH, L.; STEINHUBER, A.; JIANG, X.; SCHWARDT, O.; CUTTING, B.; SMIESKO, M.; JENAL, U.; ERNST, B.; TRAMPUZ, A. Development of an aggregation assay to screen FimH antagonists. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 3, p. 249–255, 2010.
- AIZAWA, A. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 19, p. 1–5, 1996.
- ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M. J. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to chick gut explant. **Journal of Medical Microbiology**, v.48, p. 771–780, 1999.
- AL-MARIRI, A.; TIBOR, A.; MERTENS, P.; DE BOLLE, X.; MICHEL, P.; GODEFROID, J.; WALRAVENS, K.; LETESSON, J.J. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. **Infect and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4816–4822, 2001.
- ANDREWS SC. Iron storage in bacteria. **Advances in Microbiological Physiology**, v. 40, p.281–351, 1998.
- BARNES, H. J.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: CALNEK, B. W. (Ed.). **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press Ames, Iowa, 1997. p. 131–141.
- BARNES, H.J.; LOZANO, F. Colibacillosis in poultry. In: **Pzifer veterinary practicum** Lee's summit, MO: Pfizer Animal Health, 1994. p.45.
- BEARDEN, S.W.; FETHERSTON, J.D.; PERRY, R.D. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. **Infect and Immunity**, v. 65, n. 5, p.1659–1668, 1997.

BEARDEN, S.W.; PERRY, R.D. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. **Molecular Microbiology**, v.32, n. 2, p. 403-414, 1999.

BEUG, H.; KIRCHBACH, A. VON; DÖDERLEIN, G.; CONSCIENCE, J.-F.; GRAF, T. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. **Cell**, v. 18, n. 2, p. 375–390, 1979.

BEZKOROVAINY, A., L.; SOBERG, M.; MILLER-CATCHPOLE P. Ferrous iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicum*: the effect of metals and metabolic inhibitors. **International Journal of Biochemistry**, v. 19, p. 517-522, 1987.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by VT strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p. 2953-2957, 1997.

BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; MORA, A.; JANSEN, W.H.; GARCÍA, V.; VÁQUEZ, M.L.; BLANCO, J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 229-235, 1998.

BONIFIELD, H. R.; YAMAGUCHI, S.; HUGHES, K.T. The Flagellar Hook Protein, FlgE, of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is Posttranscriptionally Regulated in Response to the Stage of Flagellar Assembly. **Journal Bacteriology**, v. 182, n. 14, p. 4044, 4050, 2000.

BOYER, E.; BERGEVIN, I.; MALO, D.; GROS, P.; CELLIER, M.F. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infect and Immunity**, v. 70, p. 6032-6042, 2002.

BRICKMAN, T. J.; HANAWA, T.; ANDERSON, M. T.; SUHADOLC, R. J.; ARMSTRONG, S. K. Differential expression of *Bordetella pertussis* iron transport system genes during infection. **Molecular Microbiology**, v.70, p. 3–14, 2008.

BRICKMAN, T. J.; VANDERPOOL, C.K.; ARMSTRONG, S.K. Heme transport contributes to in vivo fitness of *Bordetella pertussis* during primary infection in mice. **Infect and Immunity**, v. 74, p.1741-1744, 2006.

BROWN, P. K.; DOZOIS, C. M.; NICKERSON, C. A.; ZUPPARDO, A.; TERLONJE, J.; CURTISS, R., III. MlrA a novel regulator of curli (Agf) and extracellular

matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 41, p. 349–363, 2001.

BURMAN, W. J.; BREESE, P. E.; MURRAY, B. E.; SINGH, K. Y.; BATAL, H. A.; MACKENZIE, T. D.; OGLE, J. W.; WILSON, M. L., REVES, R. R.; MEHLER, P. S. Conventional and molecular epidemiology of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among urinary *Escherichia coli* isolates. **American Journal of Medicine**, v.115, p. 358–364, 2003.

CAMPOS T.A.; STEHLING E.G.; FERREIRA A.; CASTRO A.F.P.; BROCCHI M.; SILVEIRA W.D. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR-detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p.275-285, 2005.

CAMPOS, T.A.; LAGO, J.C.; NAKAZATO, G.; STEHLING, E.G.; BROCCHI, M.; de CASTRO, A.F.P.; SILVEIRA, W.D. Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p. 533-540, 2008.

CARLSON, P.E.; HORZEMPA, J.; O'DEE, D.M.; ROBINSON, C.M.; NEOPHYTOU, P. Global transcriptional response to spermine, a component of the intramacrophage environment, reveals regulation of Francisella gene expression through insertion sequence elements. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 6855–6864, 2009.

CARTRON, M.L.; MADDOCKS, S.; GILLINGHAM, P.; CRAVEN, C.J.; ANDREWS, S.C. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. **Biometals**, v. 19, n. 2, p. 143-157, 1996.

CASERO, R.A.; PEGG, A.E. Polyamine catabolism and disease. **Biochemistry Journal**, v. 21, n.13, p.323-338, 2009.

CAZA, M.; LÉPINE, F.; DOZOIS, C. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 266-282, 2011.

CAZA, M.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DOZOIS, C.; Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain in production of Salmochelins. **Infect and Immunity**, v. 76, p. 3539-3549, 2008.

CHEN C.Y.; MORSE S.A. *Neisseria gonorrhoeae* bacterioferritin: structural heterogeneity, involvement in iron storage and protection against oxidative stress. **Microbiology**, v. 194, n. 10, p. 2967–2975, 1999.

CHEN, X.; LIU, J.; GAO, S.; JIAO, X.; LIU, X. Construction of avian pathogenic *Escherichia coli* mutants with *iro* and/or *tsh* gene mutation. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 24, p. 401-408, 2008.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996–1006, 1985.

COLE, J.A. Legless pathogens: how bacterial physiology provides the key to understanding pathogenicity. **Microbiology**, v. 158, p. 1402-1423, 2012.

COLLINSON, S.K.; DOIG, P.C.; DORAN, J.L.; CLOUTHIER, S.; TRUST, T.J.; KAY, W.W. Thyn aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 12-18, 1993.

CONSTANTINIDOU, C.; HOBMAN, J.L.; GRIFFITHS, L.; PATEL, M.D.; PENN, C.W.; COLE, J.A.; OVERTON, T.W. A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 4802–4815, 2006.

CZIROK, E.; DHO, M.; HERPAY, M.; GADO, I.; MILCH, H. Association of virulence markers with animal pathogenicity of *Escherichia coli* in different models. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.37, p. 207-217, 1990.

DAS, P.; LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; CHAKRAVORTTY, D. Novel role of the nitrite transporter NirC in *Salmonella* pathogenesis: SPI2-dependent suppression of inducible nitric oxide synthase in activated macrophages. **Microbiology**, v. 155, p. 2476-2489, 2009.

DASHPER, S. G.; BUTLER, C.A; LISSEL, J.P.; PAOLINI, R.A.; HOFFMANN, B.; VEITH, P.D.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; SNELGROVE, S.L.; TSIROS, J.T; REYNOLDS, E.C. A novel *Porphyromonas gingivalis* FeoB plays a role in manganese accumulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 28095-28102, 2005.

DATSENKO K.A.; WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 97, p. 6640-6645, 2000.

DENOEL, P.A.; CRAWFORD, R.M.; ZYGMUNT, M.S.; TIBOR, A.; WEYNANTS, V.E.; GODFROID, F. Survival of a bacterioferritin deletion mutant of *Brucella melitensis* 16M in human monocyte-derived macrophages. **Infect and Immunity**, v. 65, p. 4337-4340, 1997.

DHO, M.; LAFONT, J.P. Adhesive properties and iron uptake abilities in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. **Avian Diseases**, v. 28, p.1016-1025, 1984.

DHO, M.; LAFONT, J.P. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strain in genotoxenic chickens. **Avian Diseases**, v.16, p.787-797, 1982.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v.30, p. 299-316, 1999.

DOZOIS, C.M.; DAIGLE, F.; CURTISS III R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, p. 247-252, 2003.

DOZOIS, C.M.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; FAIRBROTHER, J.M.; DESAULTELS, C.; CURTIS III, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. **Infect and Immunity**, v. 68, p. 4145-4154, 2000.

DOZOIS, C.M.; FAIRBROTHER, J.M.; HAREL, J.; BOSSÉ, M. Pap- e pil- related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infect and Immunity**, v. 60, p. 2648-2656, 1992.

DROWAL, R.; WOOLCOCK, P.R. Swollen head syndrome associated with *E.coli* and infectious bronchitis virus in central valley of California. **Avian Pathology**, v. 23, n.4, p. 733-742, 1994.

DURAND, J.M.; BJÖRK, G.R. Putrescine or a combination of methionine and arginine restores virulence gene expression in a tRNA modification-deficient mutant of *Shigella flexneri*: a possible role in adaptation of virulence. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 519–527, 2003.

EINSLE, O.; KRONECK, P.M.H. Structural basis of denitrification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 385, p. 875-883, 2004.

EMERY, D.A.; NAGARAJA, K.V.; SHAW, D.P.; NEWMAN, J.A. AND WHITE, D.G. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chicken and turkeys. **Avian Diseases**, v.36, p.504-511, 1992.

ERIKSSON, S.; LUCCHINI, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M.; HINTON, J.C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 103–118, 2003.

EWERS, C.; J ANSSEN, T.; W IELER, L.H. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v.116, n.9/10, p.381-395, 2003.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 163-176, 2007.

FANTINATTI, F.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v.41, p. 75-86, 1994.

FETHERSTON, J.D.; MIER, I.J.; TRUSZCZYNSKA, H.; PERRY, R.D. The Yfe and Feo transporters are involved in microaerobic growth and virulence of *Yersinia pestis* in bubonic plague. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 11, p.3880-3891, 2012.

FISCHBACH, M. A.; LIN, H.; LIU, D.R; WALSH, C.T. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p.571-576, 2005.

FROMMER, A.; FEIDLIN, P.J.; BOCK, R.R.; LEITNER, G.; CHAFFER, M.; HELLER, E.D. Experimental vaccination of young chickens with a live, non-pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Avian Pathology*, v. 23, n. 3, p. 425-433, 1994.

GAO, Q.; WANG, X. XU, H.; XU, Y.; LING, J.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 143, p. 1-12, 2012.

GARCIA, A. F.; BENCHIMOL, M.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. **Infect and Immunity**, v. 73, p. 2602–2610, 2005.

GAUDRY, D. Problems of rhinotracheitis vaccination. **Joint Meeting of Poultry Veterinary Study Group for EEC**, Cascais, Portugal, Mai, 1991.

GAUSS, G.H.; REOTT, M.A.; ROCHA, E.R.; YOUNG, M.J.; DOUGLAS, T.; SMITH, C.J.; LAWRENCE, C.M. Characterization of the *Bacteroides fragilis* bfr gene product identifies a bacterial DPS-like protein and suggests evolutionary links in the ferritin superfamily. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 1, p. 15-27, 2012.

GEHRING, A.M.; BRADLEY, K.A.; WALSH, C.T. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. **Biochemistry**, v. 36, n. 28, p. 8495-8503, 1997.

GEORGIADES, G.; LORDANIDIS, P.; KOUMBATI, M. Cases of swollen head syndrome in broiler chickens in Greece. **Avian Diseases**, v. 45, n.3, p.745-750, 2001.

GODALY, G.; FRENDEUS, B.; PROUDFOOT, A.; STEVENSSON, M.; KLEMM, P.; SVANBORG, C. Role of fimbriae-mediated adherence for neutrophil migration across *Escherichia coli*-infected epithelial cell layers. **Molecular Microbiology**, v. 30, n.4, p. 725-735, 1998.

GOETZ, D.H.; HOLMES, M.A.; BORREGAARD, N. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. **Molecular Cell**, v.10, n. 5, p. 1033–104, 2002.

GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J.; BALODA, S.B.; FORMAN, G.; DHO, M.; LAFONT, J.P.; WADSTRÖM, T. Virulent *Escherichia coli* strain for chicks bind fibronectin and Type II collagen. **Microbios**, v.62, p.113-127, 1990.

GRASS, G. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. **Biometals**, v. 19, n.2, p. 159-172, 2006.

GROSS, W.B. Colibacillosis, In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., REID W.M. & YODER J.H.W. (ed.) **Disease of Poultry** 9th ed. Iowa State University Press, Ames, p.138-144, 1991.

GROSS, W. G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. [s.l.] CAB International, Wallingford, United Kingdom, p. 237–259, 1994.

HAMMAR, M.; ARNQVIST, A.; BIAN, Z.; OLSEN, A.; NORMARK, S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 18, p. 661–670, 1995.

HEDGES, S.R.; AGACE, W.W.; SVANBORG, C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 266–270, 1995.

HERRERO, A.B.; LÓPEZ, M.C.; GARCÍA, S.; SCHMIDT, A.; SPALTMANN, F.; RUIZ-HERRERA J., DOMINGUEZ A. Control of filament formation in *Candida albicans* by polyamine levels. **Infect and Immunity**, v. 67, p. 4870–4878, 1999.

HERWALD, H.; MORGELIN, M.; OLSEN, A.; RHEN, M.; DAHLBACK, B.; MULLER-ESTERL, W.; BJORCK, L. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces – a clue to serious complications in infectious diseases. **Nature Medicine**, v. 4, p. 298–302, 1998.

HONE, D.M.; HARRIS, A.M.; CHATFIELD, S.; DOUGAN, G.; LEVINE, M.M. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. **Vaccine**, v. 9, n. 11, p. 810-816, 1991.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n.1, p. 39-51, 2010.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamine modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. **The Journal of Biochemistry**, v.139, n. 1, p. 13911-13916, 2006.

JANAKIRAMAN, A; SLAUCH, J.M. The putative iron transport system sitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella Typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 35, p. 1146-1155, 2000.

JANSSEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371-378, 2001.

JELSBAK, L.; THOMSEN, L.E.; WALLRODT, I.; JENSEN, P.R.; OLSEN, J.E. Polyamines Are Required for Virulence in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Plos One**, v.7, n.4, p. 36149, 2012.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p. 80–128, 1991.

JOHNSON, J.R.; MURRAY, A.C.; GAJEWSK, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.; KUSKOWISK, M.A.; SMITH, K.E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 2161-2168, 2003.

JOHNSON, T.J.; KARIYAWASAM S.; WANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE P.; JOHNSON S. J.; DOETKOTT C.; SKYBERG J.A.; LYNNE A.M.; JOHNSON J.R.; NOLAN, L.K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. **Journal Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3228-32236, 2007.

JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v. 46, p. 342-352, 2002.

JOHNSON, T.J.; SIEK, K.E.; JOHNSON, S.J.; NOLAN, L.K. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 745-758, 2006.

JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, S.J.; STELL, A.L.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, J.R.; KIM, K.S.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L.K. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from human and avian sources

reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.22, p. 7043-7050, 2008.

JOHNSON, W.; VARNER, L.; POCH, M. Acquisition of iron by *Legionella pneumophila*: role of iron reductase. **Infect and Immunity**, v. 59, p.2376-2381, 1991.

KAADEN, O. R.; LANGE, S.; STIBUREK, B. Establishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone lsc-h32. v. 18, n. 10, 1982.

KAMMLER, M.; SCHON, C.; HANTKE, K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. **Journal Bacteriology**, v. 175, n.19, p. 6212-6219, 1993.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004.

KARIYAWASAM, S.; JOHNSON, T.J.; NOLAN, L.K. The *pap* operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. **Infect and Immunity**, v. 74, p. 744-749, 2006.

KARIYAWASAM, S.; SCACCIAOCE, J.; NOLAN, L.K. Common and Specific Virulence-Associated Markers of Avian and Human Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 81-88, 2007.

KARLINSEY, J. E.; TANAKA, S.; BETTENWORTH, V.; YAMAGUCHI, S.; BOOS, W.; AIZAWA, S. I.; HUGHES, K. T. Completion of the hook–basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. **Molecular Microbiology**, v. 37, p.1220–1231, 2000.

KHARITONOV, V.G.; SUNDQUIST, A.R.; SHARMA, V.S. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 5881-5883, 1994.

KHORAMIAN-FALSAFI, T.; HARAYAMA, S.; KURSUKAKE K, PECHÈRE, J.C. Effect of motility and chemotaxis on the invasion of *Salmonella typhimurium* into HeLa cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 9, p. 47-53, 1990.

KNÖBL, T; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; FERREIRA, F.; BOTTINO, J.A.; FERREIRA, A.J.P. Some adhesins of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from septicemic poultry in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, 2006.

KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional Analysis of the Tsh Autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain Functional Analysis of the Tsh Autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. v. 72, n. 10, 2004.

KURIHARA, S.; SUZUKI, H.; OSHIDA, M.; BENNO, Y. A novel putrescine importer required for type 1 pili-driven surface motility induced by extracellular putrescine in *Escherichia coli* K-12. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10185-10192, 2011.

KURIHARA, S.; TSUBOI, Y.; ODA, S.; KIM, H.G.; KUMAGAI, H.; SUZUKI, H. The putrescine importer PuuP of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 2776–2782, 2009.

LA RAGIONE, R. M.; COOLEY, W. A.; WOODWARD, M. J. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78 : K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p.327–338, 2000a.

LA RAGIONE, R. M.; SAYERS, A. R.; WOODWARD, M. J. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78 : K80 in the day-old-chick model. **Epidemiology and Infection**, v.124, p.351–363, 2000b.

LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Virulence factor of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colispticaemia. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p. 27-35, 2002.

LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.; KUMAR, M.; RODENBERG, J.; FAN, H.; WALES, A.D.; KARACA, K. Efficacy of a Live Attenuated *Escherichia coli* O78 : K80 Vaccine in Chickens and Turkeys. **Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 273-279, 2013.

LAMARCHE, M.G.; DOZOIS, C.M.; DAIGLE, F.; CAZA, M.; CURTIS III, R.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J. Inactivation of the Pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infect and Immunity**, v.73, p. 4138-4145, 2005.

LEE H.J.; HUGHES K.T. Posttranscriptional control of the *Salmonella enterica* flagellar hook protein FlgE. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.3308 –3316, 2006.

LI, G.; EWERS, C.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; ALT, K.; DAI, J.; ANTAO, E.M.; SCHNETZ, K.; WIELER, L.H. Characterization of a yjjQ mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Microbiology**, v. 154, p. 1082-1093, 2008.

LING, J.; PAN, H.; GAO, Q.; XIONG, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; GAO, S. Aerobactin Synthesis genes *iucA* and *iucC* Contribute to the Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli* O2 Strain E058. **Plos One**, v. 27, 2013.

MALUTA, R.P.; GATTI, M.S.V.; JOAZEIRO, P.P.; PAIVA, J.B.; ROJAS, T.C.G.; SILVEIRA, F.; KOBAYASHI, R.K.T; DOZOIS, C.; SILVEIRA, W.D. Avian Pathogenic *Escherichia coli* strain SEPT362 exhibits enterotoxigenic-like activity in *in vivo* rabbit ligated ileal loop assay. **Foodborne Pathogens and Diseases**. Ahead of print.

MARGULIES, E.H.; VINSON, J.P; MILLER, W.; JAFFE, D.B.; LINDBLADTOH, K.; CHANG, J.L.; GREEN, E.D.; LANDER, E.S.; MULLIKIN, J.C. An initial strategy for the systematic identification of functional elements in the human genome by low-redundancy comparative sequencing. **Proceedings of National Academy of Science**, v.102, p.4795–4800, 2005.

MARTIN, P.; MARCG, I.; PENARY, M.; GARCIE, C.; PAVROS, D.; BOURY, M.; OLIER, M.; NOUGAYREDE, J.P.; AUDEBERT, M.; CHALUT, C.; SCHUBERT, S.; OSWALD, E. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 7, p. 1003431, 2013.

MASTROENI, P.; VAZQUEZ-TORRES, A.; FANG, F.C.; XU, Y.; KHAN, S.; HORMAECHE, C.E.; DOUGAN, G. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival *in vivo*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 237–248, 2000.

MAURER, J.J.; BROWN, T.P.; STEFFENS, W.L.; THAYER, S.G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesions, curli, and temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 42, p. 106-118, 1998.

MATURANA, V. G.; CARLOS, C.; PIRES, M. M.; CAMPOS, T. A. DE; NAKAZATO, G.; SILVEIRA, W. D. DA. Subpathotypes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Exist as Defined by their Syndromes and Virulence Traits. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 55–64, 2011.

MELAMED D.; LEITNER G.; HELLER E.D. A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 35, p.17-22. 1991.

MCPEAKE, S. J. W.; SMYTH, J. A.; BALL, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 3-4, p. 245-53, 2005.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; III, R. C.; BROWN, P. K.; ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J. M.; ARNE, P.; BRE, A. Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to Serum and in Pathogenicity, **Infect and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

MILLS, C.E.; SEDELNIKOVA, S.; SOBALLE, B.; HUGHES, M.N.; POOLE, R.K. *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp) with equistoichiometric FAD and haem contents has a low affinity for dioxygen in the absence or presence of nitric oxide. **Biochemistry Journal**, v. 353, p. 207-213, 2001.

MIMS, C.A. **Mims' Pathogenesis of Infectious Disease**. London: Academic Press, 1995.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and Structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 25-52, 1996.

MOON, H.W. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 151, p. 148-165, 1990.

MORLEY, A.J.; THOMSON, D.K. Swollen-head syndrome in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 28, p. 238-243, 1984.

MOULIN-SHOULEUR, M.; REPERANT, M.; LAURENT, S.; BREE, A., MIGNON-GRASTEAU, S.; GERMON, P.; RASSCHAERT, D.; SCHOULER, C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3366-3376, 2007

NAIKARE, H.; PALYADA, K.; PANCIERA, R.; MARLOW, D.; STINTZI, A. Major role for FeoB in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. **Infect and Immunity**, v. 74, n.10, p.5433-44, 2006.

NAKAMURA, K.; COOK, J.K.A.; FRAZIER, J.A.; NARITA, M. *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated with infections bronchitis virus and *E. coli*. **Avian Diseases**, v.36, p.881-890, 1992.

NAKAMURA, K.; MASE, M.; TANIMURA, N.; YAMAGUCHI, S.; NAKAZAWA, M.; YUASA, N. Swollen head syndrome in broiler chickens in Japan its pathology, microbiology and biochemistry. **Avian Pathology**, v. 26, n.1, p.139-154, 1997.

NASRALLAH, G.K.; RIVEROLL, A.L.; CHONG, A.; MURRAY, L.E.; LEWIS, P.J. Legionella pneumophila Requires Polyamines for Optimal Intracellular Growth. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 4346–4360, 2011.

OLSÉN, A.; ARNQVIST, A.; HAMMAR, M.; SUKUPOLVI, S.; NORMAK, S. The RpSo sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of csgA, the subunit gene of fribronectin-binding curli in Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, v. 7, p. 523-536, 1993.

OLSÉN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli. **Nature**, v. 338, p. 652-655, 1989.

ORNDORFF, P.E. 1994. *Escherichia coli* type 1 pili, in: Miller, V.L., Kaper, J.B., Portnoy, D.A., Isberg, R.R. (Eds.). **Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis**. ASM Press, Washington, DC, pp. 91-111.

PACE, F.; NAKAZATO, G.; PACHECO, A.; PAIVA, J.B.; SPERANDIO, V.; SILVEIRA, W.D. The Type VI Secretion System Plays a Role in Type 1 Fimbria Expression and Pathogenesis of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. **Infect and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 4990-4998, 2010.

PACE, F.; BOLDRIN, J.P.; NAKAZATO, G.; LANCELLOTTI, M.; SIRCILI, M.; GUEDES, E.; SILVEIRA, W.D.; SPERANDIO, V. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. **Microbiology**, v.150, n.10, p. 2954-2962, 2011.

PAGE, L.; GRIFFITHS, L.; COLE, J.A. Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 154, p. 349-354, 1990.

PARKINSON, J. S.; PARKER, S.R.; TALBERT, P.B.; HOUTS, S.E. Interactions between chemotaxis genes and flagellar genes in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 155, p. 265-274, 1983.

PARREIRA, V.R.; YANO, T. Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 111-119, 1998.

PEEK, A. S.; SOUZA, V.; EGUIARTE, L.E.; GAUT, B.S. The interaction of protein structure, selection, and recombination on the evolution of the type 1 fimbrial major subunit (*fimA*) from *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Evolution**, v. 52, p. 193-204, 2001.

PITTARD, J.; CAMAKARIS, H.; YANG, J. The TyrR regulon. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 16-26, 2005.

PISTOCCHI, R. ; KASHIWAGI, K. ; MIYAMOTO, S.; NUKUI, E.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI, K. Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps at 19 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 146-152, 1993.

POLLACK, J.R.; NEILANDS, J.B. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 38, n.5, p. 989-992, 1970.

POURBAKHS, S.A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAULTELS, C.; MARTINEAU-DOIZE, B.; FAIRBROTHER, J.M. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **The Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 22, p. 231-241, 1997.

QUEL, N.G.; ARAGÃO, A.Z.; SALVADORI, M.R.; FARIAS, A.S.; JOAZEIRO, P.P.; SANTOS, L.M.; SÁ, L.R.; FERREIRA, A.J.; YANO, T. Cellulitis lesions in broiler chickens are induced by *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF). **Veterinary Microbiology**, v. 23, n. 162, p. 866-872, 2013.

ROBEY, M.; CIANCOTTO, N.P. *Legionella pneumophila feoAB* promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. **Infect and Immunity** v. 70, p. 5659-5669, 2002.

ROJAS, T.C.G.; PARIZZI, L. P. TIBA, M.R.; CHEN, L.; PEREIRA, G.A.G.; SANGAL, V.; YANG, V.; YANG, J.; YU, J.; SILVEIRA, W.D. Draft Genome of a Brazilian Avian-Pathogenic *Escherichia coli* Strain and *In Silico* Characterization of Virulence-Related Genes. **Journal Bacteriology**, v. 194, n. 11, p. 3023, 2012.

ROSENBERGER, J.K.; FRIES, P.A.; CLOUD, S.S.; WILSON, R.A. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. **Avian Diseases**, v. 29, n.2, p. 1094-107, 1985.

RUNYEN-JANECKY, L. J.; REEVES, S.A.; GONZALES, E.G.; PAYNE, S.M. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. **Infect and Immunity**, v. 71, p. 1919-1928, 2003.

RUSSO, B.C.; HORZEMPA, J.; O'DEE, D.M.; SCHMITT, D.M.; BROWN, M.J. A *Francisella tularensis* locus required for spermine responsiveness is necessary for virulence. **Infect and Immunity**, v.79, n.9, p. 3665-3676, 2011.

SABRI, M. ; CAZA, M. ; PROULX, J. ; LYMBEROPOULOS, M.H.; BREE, A. ; MOULIN-SCHOULEUR, M. ; CURTISS III, R. ; DOZOIS, C.M. Contribution of the *SitABCD*, *MntH*, and *FeoB* metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. **Infect and Immunity**, v. 76, p. 601-611, 2008.

SABRI, M.; LEVEILLÉ, S.; DOZOIS, C.M. A *SitABCD* homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. **Microbiology**, v. 152, p. 745-758, 2006.

SAITO, T.; UENO, T.; YAMAGUCHI, S.; LINO, T.; AIZAWA, S.I. Flagellar filament elongation can be impaired by mutations in the hook protein FlgE of *Salmonella typhimurium*: a possible role of the hook as a passage for the anti-sigma factor FlgM. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 6, p.1129-1139, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring harbor Laboratory Press, NY, pp.1584, 2001.

SCHILLER, D.; KRUSE, D.; KNEIFEL, H.; KRAMER, R.; BURKOVSKI, A. Polyamine transport and role of *potE* in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 6247–6249, 2000.

SCHNEIDER, B.L.; HERNANDEZ, V.J.; REITZER, L. Putrescine catabolism is a metabolic response to several stresses in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 537-550, 2013.

SCHUBERT, S.; PICARD, B.; GOURIOU, S.; HEESEMANN, J.; DENAMUR, E. *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Infect and Immunity**, v. 70, p. 5335–5337, 2002.

SEBKOVÁ, A.; KARASOVÁ, D.; CRHANOVÁ, M.; BUDINSKÁ, E.; RYCHLIK, I. *aro* Mutations in *Salmonella enterica* Cause Defects in Cell Wall and Outer Membrane Integrity **Journal of Bacteriology**, v. 190, n.9, p. 3155-3160, 2008.

SHOWE, M.K.; DEMOSS, J.A. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 95, p. 1305-1313, 1968.

SILVA, E.N. Características de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. [Livre-docência]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1986.

SILVEIRA, W.D.; FERREIRA, A.; LANCELLOTTI, M.; BARBOSA, I.A.G.C.D.; LEITE, D.S.; CASTRO, A.F.P.; BROCCHI M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p.323-32, 2002.

SKYBERG, J.A.; JOHNSON, T.J.; NOLAN, L.K. Mutational and transcriptional analyses of avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. **BMC Microbiology**, v. 29, p. 24, 2008.

SMITH, H. W. The hemolysins of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.85, p. 197-211, 1963.

SMYTH C.J. Flagella their role in virulence. In. Owen P, Foster TJ (eds) **Immunochemical and molecular genetics analysis of bacterial pathogens**. Amsterdam, Elsevier, p. 3-11, 1988.

STOJILJKOVIC, I.; COBELJIC, M.; HANTKE, K. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, p. 111-115, 1993.

STORDEUR, P.; MARLIER, D.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BIET, F.; DHO-MOULIN, M.; MAINIL, J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. **Veterinary microbiology**, v. 84, n. 3, p. 231–241, 2002.

STRITZER, J.; JANDA, J.; SCHOEN, C.; TAUPP, M.; PILGRIM, S.; GENTSCHEV, I.; SCHREIDER, P.; GEGINAT, G.; GOEBEL, W. Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes aro* mutants. **Infect and Immunity**, v.72, n. 10, p.5622-5629, 2004.

STURGILL, G.; RATHER, P.N. Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 437–446, 2004.

TERUI, Y.; HIGASHI, K.; TABEL, Y.; TOMITORI, H.; YAMAMOTO, K.; ISHIHAMA, A. Enhancement of the synthesis of RpoE and StpA by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* under heat shock conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 5348–5357, 2009.

TKACHENKO, A.G.; PSHENICHNOV, M.R.; SALAKHETDINOVA, O.; NESTEROVA, L. The role of putrescine and the energy state of *Escherichia coli* in regulation of DNA topology during adaptation to oxidative stress. **Mikrobiologiya**, v. 68, p. 27–32, 1999.

TERUI, Y.; SAROJ, S.D.; SAKAMOTO, A.; YOSHIDA, T.; HIGASHI, K.; KURIHARA, S.; SUZUKI, H.; TOIDA, T.; KASHIWAGI, K.; IGARASHI, K. Properties of putrescine uptake by PotFGHI and PuuP and their physiological significance in *Escherichia coli*. *Amino Acids*, v. 46, n. 3, p. 661–670, 2013

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

UBABEF. Relatório Anual, 2013 disponível em:
<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>.

VAN DAM, L.; KOROLEV, N.; NORDENSKIOLD, L. Polyamine-nucleic acid interactions and the effects on structure in oriented DNA fibers. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 2, p. 419–428. 2002.

VAZQUEZ-TORRES, A.; FANG, F.C. Oxygen-dependent anti-Salmonella activity of macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 9, n.1, p. 29–33, 2001.

VAZQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; MASTROENI, P.; ISCHIROPOULOS, H.; FANG, F.C. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages *in vitro*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p.227–236, 2000.

VELAYUDHAN, J.; CASTOR, M.; RICHARDSON, A.; MAIN-HESTER, K.L.; FANG, F.C. The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 63, p. 1495–1507, 2007.

VELAYUDHAN, J.; HUGHES, N.J.; MCCOLM, A.A; BAGSHAW, J.; CLAYTON, C.L; ANDREWS, S.C.; KELLY, D.J. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 274-286, 2000.

VIDOTTO, C.M.; MULLER, E.E.; FREITAS, C.J. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases** v. 34, n. 3, p. 531-538, 1990.

VIDOTTO, M.C.; NAVARRO, H.R.; GAZIRI, L.C. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 79-87, 1997.

WALTERS, M.; SIRCILI, M. P.; SPERANDIO, V. AI-3 Synthesis Is Not Dependent on luxS in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5668–5681, 2006.

WARE, D.; LIN, J.Y.; SWIATLO, E. Involvement of PotD in *Streptococcus pneumoniae* polyamine transport and pathogenesis. **Infect and Immunity**, v. 74, p. 352-361, 2006.

WEINSTEIN, D.L.; CARSIOTIS, M.; LISSNER, C.R.; O'BRIEN, A.D. Flagella help *Salmonella typhimurium* survive within murine macrophages. **Infect and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 819–825, 1984.

WILLIAMS, P.H.; WARNER, P.J. Col V plasmid-mediated, colicin V independent iron uptake system of invasive strains of *Escherichia coli*. **Infect and Immunity**, v. 29, p.411-416, 1980.

WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S.; BROWN, T.P.; GLISSON, J.R.; STEFFENS, W.L.; MAURER, J.J. Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. **Avian Diseases**, v. 42, p. 194-198, 1998.

XIE Q, NATHAN C. The high-output nitric-oxide pathway role: role and regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, p. 576-582, 1994.

YOGARATNAM, V. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. **Veterinary Records**, v.137, p215-217, 1995.

YOSHIDA, M.; KASHIWAGI, K.; SHIGEMASA, A.; TANIGUCHI, S.; YAMAMOTO, K.; MAKINOSHIMA, H. A nifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 46008–46013, 2004.

ZAAS, D. W.; DUNCAN, M. J.; LI, G.; WRIGHT, J. R.; ABRAHAM, S. N. Pseudomonas Invasion of Type I Pneumocytes Is Dependent on the Expression and Phosphorylation of Caveolin-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4864–4872, 2005.

ZHAO, L.; GAO, S.; HUAN, H.; XU, X.; ZHU, X.; YANG, W.; GAO, Q.; LIU, X. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *Escherichia coli* in murine urinary tract infection model and chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, p.1634-1644, 2009.

ZHENG, M.; WANG, X.; TEMPLETON, L.J.; SMULSKI, D.R.; LAROSSA, R.A.; STORZ, G. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v.183, p. 4562–4570, 2001.

ZHOU L.; WANG, J.; JHANG, L. Modulation of Bacterial Type III Secretion System by a Spermidine Transporter Dependent Signaling Pathway. **Plos One**, v.12, p.1291, 2007.



CEUA/Unicamp

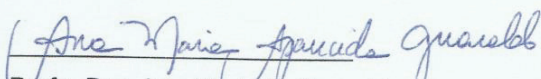
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

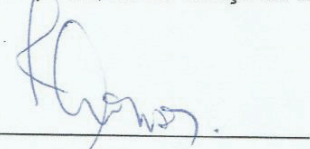
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICAS PARA AVES (APEC) E UROPATOGÊNICAS (UPEC) PARA HUMANOS" (protocolo nº 2669-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira / Renato Pariz Maluta, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 26 de março de 2012.

Campinas, 26 de março de 2012.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 2

ADENDO TERMO DE RESPONSABILIDADE PARA PESQUISA COM USO DE ANIMAIS

1- Protocolo No. 2669-1(A)

2- Título do projeto: Caracterização Molecular de Linhagens de Escherichia coli Patogênicas para Aves (APEC) e Uropatogênicas (UPEC) para Humanos

2.1. Sub-projeto: MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA EM UMA LINHAGEM DE Escherichia coli (APEC) CAUSADORA DE SÍNDROME DE CABEÇA INCHADA EM AVES: ANÁLISE IN VITRO E IN VIVO

3. Período. Início: julho/2013 a Término: dezembro/2013

4. Executor(es): JACQUELINE BOLDRIN DE PAIVA

Nível acadêmico: Aluna de Doutorado

Nome do orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Unidade/Departamento: Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana/Depto. de Genética, Evolução e Biagentes

Telefone: (19) 3521-1160

E-mail: jackboldrin@hotmail.com

Agência Financiadora: Fapesp Projeto 2010/50596-9

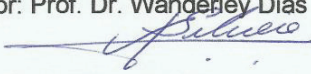
Termo de Responsabilidade

Eu asseguro à CEUA/UNICAMP que:

- Li os Princípios Éticos para Uso de Animais de Laboratório (disponível no endereço: <http://www.cobea.org.br/>), elaborado pela SBCAL - Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório - e concordo plenamente com suas exigências durante a vigência deste protocolo; assim como a legislação nacional vigente - Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008 (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm).
- Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe que participa deste projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos nesse protocolo;
- Comprometo-me a solicitar nova aprovação deste protocolo sempre que ocorra alteração significativa nos experimentos aqui descritos;
- Tudo o que foi declarado nesse protocolo é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade (pesquisador principal) e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.

Data: 11 de fevereiro de 2014

Nome do Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Assinatura: 

Nome do Executor: Jacqueline Boldrin de Paiva

Assinatura: 