



LIVIA PILATTI MENDES DA SILVA

**CONSTRUÇÃO DE MUTANTES PARA OS GENES
ychO, *luxS* E *qseC* PRESENTES EM UMA LINHAGEM
DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES
(APEC): ANÁLISES *in vivo* E *in vitro***

Campinas 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LIVIA PILATTI MENDES DA SILVA

“CONSTRUÇÃO DE MUTANTES PARA OS GENES *ycho*, *luxS* E *qseC* PRESENTES EM UMA LINHAGEM DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC): ANÁLISES IN VIVO E IN VITRO”

Este exemplar corresponde à redação final da DISSERTAÇÃO defendida pela candidata

**LIVIA PILATTI
MENDES DA SILVA**

e aprovada pela Comissão Julgadora.

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Orientador: Dr. Wanderley Dias Da Silveira

CAMPINAS,
2014

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

D26c Da Silva, Livia Pilatti Mendes, 1989-
Construção de mutantes para os genes ychO, luxS e qseC presentes em uma linhagem de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) : análises in vivo e in vitro / Livia Pilatti Mendes da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. *Escherichia coli* patogênica aviária. 3. Fatores de virulência. 4. Adesinas bacterianas. 5. *Quorum sensing*. I. Dias da Silveira, Wanderley, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mutant construction for ychO, luxS and qseC genes present in an Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) : in vivo and in vitro analysis

Palavras-chave em inglês:

Escherichia coli

Avian pathogenic *Escherichia coli*

Virulence factors

Bacterial adhesins

Quorum sensing

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Wanderley Dias da Silveira [Orientador]

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Marcelo Brocchi

Data de defesa: 25-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 25 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. Wanderley Dias da Silveira (orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Profª. Dra. Isabel Cristina Affonso Scaletsky

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Assinatura

Resumo

Linhagens de *Escherichia coli* patogênicas para aves (APEC) causam doenças extraintestinais em aves, levando a perdas econômicas consideráveis para a indústria avícola em todo o mundo. Fatores de virulência, ainda não conhecidos, podem apresentar papéis importantes na patogenicidade, os quais podem ser significativos para o desenvolvimento de medidas de controle de processos infecciosos dessas linhagens. Invasinas permitem que o patógeno invada células hospedeiras, sobrepujando as defesas do hospedeiro, por interagir com receptores específicos na superfície celular. Baseando-se em análises do genoma da linhagem APEC SEPT362, detectou-se a presença de uma provável invasina, homóloga ao gene *ychO*, ainda não caracterizado, da linhagem *E. coli* str. K-12 substr. MG1655, sendo seu efeito na patogenicidade estudado. Neste trabalho, a linhagem SEPT362 deficiente para *ychO* reduziu a taxa de mortalidade em pintos, a adesão a células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG), a invasão em células fibroblasto de embrião de galinha (CEC-32), a sobrevivência em macrófagos de aves (HD11), a formação de biofilme e a motilidade. Esses resultados sugerem, pela primeira vez, que o gene *ychO* codifica para uma invasina e que tem papel na patogenicidade da linhagem APEC SEPT362. Além dos diversos fatores de virulência, o estudo de diferentes tipos de sinais extracelulares que medeiam a comunicação entre bactérias e regulam a expressão gênica abre grandes possibilidades no estudo de mecanismos de patogenicidade e possíveis meios de interferir nos mesmos, transformando organismos patogênicos em organismos não virulentos. *Quorum sensing* (QS) é um mecanismo dependente da densidade celular bacteriana que as permitem agir como complexos multicelulares, aumentando suas chances de sobrevivência no meio ambiente. O sistema QS autoindutor 2 (AI-2) é um sistema de comunicação universal de bactérias mediado pelo AI-2, produzido pela ação da enzima LuxS. O sistema QS autoindutor 3 (AI-3) é um sistema que pode, também, mediar a comunicação entre reinos, sendo regulado pela histidina quinase QseC. Neste contexto, mutantes para os genes *luxS* e *qseC* foram construídos na linhagem SEPT362. A linhagem deficiente para *luxS* apresentou uma redução significativa na adesão a células FEG, devido a um papel do gene na regulação da fímbria do tipo 1. A linhagem deficiente para *qseC* teve uma menor taxa de mortalidade em pintos e uma redução significativa na adesão a células FEG, pela falta da fímbria do tipo 1 no mutante.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, APEC, patogenicidade, invasina, *quorum sensing*.

Abstract

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains cause extraintestinal diseases in poultry, leading to substantial economic losses to the poultry industry worldwide. Virulence factors not yet known may play important roles in pathogenicity, which may be significant for measures control development of infectious processes of these strains. Invasins allow the pathogen to invade host cells, overcoming host defenses by interacting with specific cell surface receptors. Based on analysis of APEC SEPT362 strain genome detected the presence of a putative invasin gene homologous to *ychO*, not yet characterized, of *E. coli* str. K-12 substr. MG1655, and its effect on pathogenicity was studied. In this work, the SEPT362 strain deficient for *ychO* reduced the mortality rate in chicks, the adherence to chicken embryo fibroblast (CEF) cells, the invasion of chicken embryo cells (CEC-32), the survival in poultry macrophages (HD11), the motility and biofilm formation. These results suggest, for the first time, that *ychO* gene encodes for an invasin and plays a role in APEC SEPT362 pathogenicity. In addition to the many virulence factors, the study of different types of extracellular signals that mediate communication between bacteria and regulate gene expression opens up great possibilities to study pathogenic mechanisms and possible ways to interfere in it, transforming pathogenic organisms into non-virulent organisms. *Quorum sensing (QS)* is a mechanism dependent on the bacterial cell density that enables them to act as multicellular complexes, increasing their chances of survival in the environment. The *QS* system autoinducer 2 (AI- 2) is a universal communication system of bacteria mediated by AI- 2 produced by the action of the enzyme LuxS. The *QS* system autoinducer 3 (AI- 3) is a system that can also mediate communication between realms, being regulated by kinase QseC. In this context, mutants for the *luxS* and *qseC* genes were built in SEPT362 strain. The strain deficient for *luxS* showed a significant reduction in CEF cell adhesion due to a role in the regulation of gene type 1 fimbriae. The deficient strain for *qseC* had a lower rate of mortality in chicks and a significant reduction in cell adhesion to CEF, due to a lack of type 1 fimbriae in the mutant.

Keywords: *Escherichia coli*, APEC, pathogenicity, invasin, *quorum sensing*.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Justificativa.....	3
3. Revisão Bibliográfica	3
3.1. <i>Escherichia coli</i> Patogênica para Aves (APEC).....	3
3.2. Invasinas.....	6
3.3. <i>Quorum sensing</i>	7
3.3.1. Sistema AI-2.....	8
3.3.2. Sistema AI-3.....	13
3.3.3. <i>Quorum quenching</i>	16
4. Objetivos	17
5. Material e Métodos.....	17
5.1. Linhagem bacteriana	17
5.2. Caracterização <i>in silico</i>	17
5.3. Extração RNA.....	18
5.4. Análises de expressão <i>in vivo</i> por qRT-PCR.....	18
5.5. Quantificação da transcrição através de qRT-PCR.....	18
5.6. Construção do mutante.....	19
5.6.1. Inserção do cassete de cloranfenicol no plasmídeo pKD46 (pKD46Cm) e transformação na linhagem SEPT362.....	19
5.6.2. Iniciadores para construção de mutantes	21
5.6.3. Construção do Inserto.....	22
5.6.4. Eletroporação do Inserto	23
5.6.5. Seleção e confirmação do mutante.....	23
5.7. Construção da linhagem complementada	25
5.8. Curva de crescimento.....	27
5.9. Experimentos de Patogenicidade <i>in vivo</i>	27
5.10. Ensaio de motilidade do tipo <i>swimming</i>	27
5.11. Ensaio de Formação de Biofilme.....	28
5.12. Ensaio de adesão a Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG)	28
5.13. Ensaio de Invasão em células CEC-32 cultivadas <i>in vitro</i>	29
5.14. Ensaio de Sobrevivência em Macrófago.....	30

6. Resultados	31
6.1. Análise <i>in silico</i>	31
6.2. Expressão dos genes <i>ychO</i>, <i>luxS</i> e <i>qseC</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	33
6.3. Modificação da resistência do plasmídio pKD46	33
6.4. Construção e análise das linhagens mutante e complementada	35
6.4.1. Gene <i>ychO</i>	35
6.4.1.1. Construção do mutante $\Delta ychO$ e seu complementado	35
6.4.1.2. Análise da expressão gênica e curva de crescimento	36
6.4.1.3. Avaliação da taxa de mortalidade em aves infectadas	38
6.4.1.4. Motilidade e formação de biofilme	39
6.4.1.5. Adesão em fibroblastos de embrião de galinha (FEG)	41
6.4.1.6. Invasão em células CEC-32	43
6.4.1.7. Sobrevivência em macrófagos HD11	44
6.4.2. Gene <i>luxS</i>	45
6.4.2.1. Construção do mutante $\Delta luxS$ e seu complementado	45
6.4.2.2. Análise da expressão gênica e curva de crescimento	46
6.4.2.3. Avaliação da taxa de mortalidade em aves infectadas	48
6.4.2.4. Motilidade e formação de biofilme	48
6.4.2.5. Adesão em fibroblasto de embrião de galinha (FEG)	50
6.4.2.6. Invasão em células CEC-32	50
6.4.2.7. Sobrevivência em macrófagos HD11	53
6.4.3. Gene <i>qseC</i>	53
6.4.3.1. Construção do mutante $\Delta qseC$ e seu complementado	53
6.4.3.2. Análise de expressão gênica e curva de crescimento	55
6.4.3.3. Avaliação da taxa de mortalidade em aves infectadas	56
6.4.3.4. Motilidade e formação de biofilme	57
6.4.3.5. Adesão em células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG)	58
6.4.3.6. Invasão em células CEC-32	59
6.4.3.7. Sobrevivência em macrófagos HD11	62
7. Discussão	63
7.1. Mutação no gene <i>ychO</i> e os efeitos desta mutação	63
7.2. Mutação no gene <i>luxS</i> e os efeitos desta mutação	68

7.3. Mutação no gene <i>qseC</i> e os efeitos desta mutação	71
8. Conclusões	75
9. Perspectivas	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	93
ANEXO A – Certificados Comissão de Ética no Uso De Animais (CEUA)	93
ANEXO B – Certificados Comissão de Ética no Uso De Animais (CEUA)	95

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a toda minha família, especialmente aos meus pais, Luiz Antônio Mendes da Silva e Eliane Pilatti da Silva, e ao meu irmão, Marcelo Pilatti Mendes da Silva, que mesmo distantes, estiveram sempre comigo, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial.

Agradeço ao Marcel Mafei Serracchiani, que esteve comigo em todos os momentos, pelo apoio, força e incentivo e por todo amor e carinho que me ajudaram a passar por mais esta fase da minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Wanderley Dias da Silveira por acreditar em mim e aceitar-me como orientanda. E também à minha coorientadora Doutora Janaína Luisa Leite, pela amizade e pelo incentivo e apoio durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Não haveria como descrever a imensa ajuda que tive da minha colega e amiga Jacqueline Boldrin de Paiva que me axíliou durante todo o desenvolvimento dessa dissertação. Obrigada pela dedicação, carinho, amizade, e por ter tomado alguns ensaios como se fossem seus, ajudando-me inclusive em finais de semana e feriados.

Agradeço, também, aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, Bianca Cristina Zupirolli, Cristiane Mabilon, Flávio Silveira, Murilo Lino Buttton, Renato Felix da Silva, Renato Pariz Maluta, Renu Verma, Ricardo Henri Rodrigues Destefano e Thaís Cabrera Galvão Rojas, por me auxiliarem, me ouvirem e ajudarem a tornar o dia a dia um pouco mais divertido.

Gostaria de agradecer a todos meus amigos e pessoas que fizeram parte das etapas da minha vida acadêmica e profissional, que contribuíram substancialmente para que eu concluísse com sucesso mais uma etapa de minha vida. Em especial, aos meus colegas do curso de Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, aos meus ex-orientadores e ex-colegas de estágio do Centro de Citricultura do Instituto Agrônômico de Campinas, e do Instituto Carlos Chagas da Fiocruz.

Agradeço a todas as moradoras, ex-moradores e amigos da Casa da Martinha, por me acolherem e terem feito meus dias em Barão Geraldo muito mais felizes e divertidos.

Agradeço à Globo Aves por ceder as aves, à Professora Doutora Fabiana Horn (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) por providenciar os macrófagos de galinha e a as células CEC-32, e à Professora Doutora Clarisse Weis Arns, por ceder as células FEG. Agradeço também ao Prof. Dr. Gerson Nakazato e ao Doutorando Rogério Arcuri Conceição, pelo auxílio com os ensaios celulares.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e à FAPESP, pelo auxílio financeiro (2012/04391-1 e 2012/09655-7).

Divido com todos vocês mais uma etapa de minha vida.

“Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos. Os homens esqueceram essa verdade, mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

Antoine de Saint - Exupéry

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Esquema de produção do AI-2.	10
Figura 2 – Via de regulação LsR: detecção e internalização de AI-2.	11
Figura 3 – Vias de produção de homocisteína em <i>E. coli</i>	12
Figura 4 – Modelo da cascata de sinalização do QseC em EHEC.	15
Figura 5 - Estrutura da proteína YchO. (A) Predição topológica da proteína obtida pelo servidor I-Tasser. (B) Os domínios e suas posições desenhados no MyDomains-ImageCreator.	32
Figura 6 – Análise de expressão <i>in vivo</i> , em baço e em pulmão de pintos de um dia inoculados com 10 ⁸ UFC/ml via saco aéreo direito, 24 e 48 horas após a inoculação, comparando-se com a expressão <i>in vitro</i> em LB.	33
Figura 7 - Gel de agarose 0,8%. Confirmação da construção do plasmídio pKD46Cm. (A) Confirmação por comparação de plasmídios (B) Confirmação pela amplificação cassete de cloranfenicol.....	34
Figura 8 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção linhagem mutante utilizando iniciadores que flanqueiam externamente o gene <i>ychO</i>	35
Figura 9 - Gel de agarose 0,8%. Confirmação da construção da linhagem complementada do mutante $\Delta ychO$	36
Figura 10 – Análise de expressão por qRT-PCR do gene <i>ychO</i> nas linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i> crescidas em DMEM.	37
Figura 11 – Curvas de crescimento comparando as linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i>	37
Figura 12 - Perfil de mortalidade das aves infectadas com 10 ⁹ UFC/ml (n=20) das linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i>	38
Figura 13 - Motilidade do tipo <i>Swimming</i> nas linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i>	39
Figura 14 - Análise de expressão dos genes <i>fliC</i> , <i>fliD</i> , <i>motA</i> e <i>flgE</i> nas linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i> crescidas em DMEM.	40
Figura 15 - Formação de biofilme 24 e 48 horas após a inoculação em DMEM em placas de poliestireno ($\Delta ychO$).	41
Figura 16 - Quantificação da adesão das linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i> na linhagem celular Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG), na ausência e na presença do análogo da manose methyl-alpha-D-mannopyranoside.	42
Figura 17 – Análise da expressão gênica de genes relacionados à adesão nas linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i>	42
Figura 18 - Ensaio de invasão das linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i> em célula CEC-32.....	43
Figura 19 - Sobrevivência das linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e <i>C.ΔychO</i> em macrófagos HD11.....	44

Figura 20 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção linhagem mutante utilizando iniciadores que flanqueiam externamente (A) e internamente (B) o gene <i>luxS</i>	45
Figura 21 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção da linhagem complementada do mutante <i>luxS</i> SEPT362.	46
Figura 22 - Análise de expressão de <i>luxS</i> qRT-PCR, nas linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e <i>C.$\Delta luxS$</i> crescidas em DMEM.	47
Figura 23 - Curvas de crescimento comparando as linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e <i>C.$\Delta luxS$</i>	47
Figura 24 - Perfil de mortalidade das aves infectadas com 10^9 UFC/ml (n=20) das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e <i>C.$\Delta luxS$</i>	48
Figura 25 - Motilidade do tipo <i>Swimming</i> ($\Delta luxS$).	49
Figura 26 - Formação de biofilme 24 e 48 horas após a inoculação em DMEM em placas de poliestireno das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e <i>C.$\Delta luxS$</i>	49
Figura 27 - Adesão à linhagem celular Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG) na ausência e na presença do análogo da manose methyl-alpha-D-mannopyranoside.	51
Figura 28 - Análise de expressão do gene <i>fimH</i> nas linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e <i>C.$\Delta luxS$</i>	52
Figura 29 - Ensaio de invasão das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e <i>C.$\Delta luxS$</i> em células CEC-32	52
Figura 30 - Sobrevivência das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e <i>C.$\Delta luxS$</i> em macrófagos HD11.	53
Figura 31 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção linhagem mutante utilizando iniciadores que flanqueiam externamente (A) e internamente (B) o gene <i>qseC</i>	54
Figura 32 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção do complementado do mutante <i>qseC</i> SEPT362.	55
Figura 33 - Análise de expressão, utilizando qRT-PCR, de <i>qseC</i> nas linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e <i>C.$\Delta qseC$</i> crescidas em DMEM.	55
Figura 34 - Curvas de crescimento comparando-se as linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e <i>C.$\Delta qseC$</i>	56
Figura 35 - Perfil de mortalidade das aves infectadas com 10^9 UFC/ml (n=20) das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e <i>C.$\Delta luxS$</i>	57
Figura 36 - Motilidade do tipo <i>Swimming</i> das linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e <i>C.$\Delta qseC$</i>	58
Figura 37 - Formação de biofilme 24 e 48 horas após a inoculação em meio DMEM em placas de poliestireno pelas linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e <i>C.$\Delta qseC$</i>	58
Figura 38 - Quantificação da adesão à linhagem celular Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG)	60
Figura 39 - Análise de expressão do gene <i>fimH</i> nas linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e <i>C.$\Delta qseC$</i>	61
Figura 40 - Ensaio de invasão das linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e <i>C.$\Delta qseC$</i> em células CEC-32.	61
Figura 41 - Sobrevivência das linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e <i>C.$\Delta qseC$</i> em macrófagos HD11.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1- Iniciadores utilizados para PCR em tempo real.	20
Tabela 2- Iniciadores para amplificação do cassete de cloranfenicol.	21
Tabela 3 - Iniciadores para construção de mutantes para os genes <i>ychO</i> , <i>luxS</i> e <i>qseC</i>	22
Tabela 4 - Iniciadores para confirmação da deleção dos genes <i>ychO</i> , <i>luxS</i> e <i>qseC</i>	24
Tabela 5 - Iniciadores para construção dos complementados dos mutantes $\Delta ychO$, $\Delta luxS$ e $\Delta qseC$	26

Lista de Abreviaturas e Siglas

- $\Delta luxS$ – mutante nulo para o gene *luxS*
- $\Delta qseC$ – mutante nulo para o gene *qseC*
- $\Delta ychO$ – mutante nulo para o gene *ychO*
- A/E – *Attachement and Effacement*
- AHLs – Acyl-Homocery-Lactonas
- AI-2 – Autoindutor-2
- AI-3 – Autoindutor-3
- APEC – *Avian Pathogenic Escherichia coli*
- C. $\Delta luxS$ – linhagem complementada com o gene *luxS*
- C. $\Delta qseC$ – linhagem complementada com o gene *qseC*
- C. $\Delta ychO$ – linhagem complementada com o gene *ychO*
- CMA – Ciclo do Metil Ativado
- DPD – 4,5-diidroxi-2,3-pentadiona
- E. coli* – *Escherichia coli*
- EHEC – *Enterohemorrhagic E. coli*
- EPEC – *Enterioathogenic E. coli*
- LEE – *Locus of Enterocyte Effacement*
- QS – *Quorum Sensing*
- SAH- S-adenosil-homocisteína
- SAM – S-adenosil-metionina
- SRH- S-ribosil-homocisteína
- UPEC- *Uropathogenic E. coli*

1. Introdução

O Brasil é o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo. Em 2012, o total de carne de frango produzida no Brasil foi de aproximadamente 12,7 milhões de toneladas, das quais 69% foram consumidas no mercado interno, garantindo a manutenção de 3,6 milhões de postos de trabalhos diretos e indiretos (UBABEF, 2013) e produzindo alimentos de alto valor nutritivo, com preços relativamente baixos. A avicultura no Brasil responde, sozinha, por cerca de 1,5% do produto interno bruto (PIB). Apesar de ser um importante segmento econômico, o sistema de criação de alta densidade faz com que a indústria avícola esteja sujeita a fatores que podem afetar, de maneira significativa, os seus rendimentos e custos (Matter *et al.*, 2011). Entre estes fatores, destacam-se as doenças infecciosas causadas por microrganismos patogênicos (vírus, bactérias e fungos) e, principalmente, pela bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), agente significativo de morbidade e mortalidade (Gross, 1961).

Linhagens de *E. coli*, isoladas de processos infecciosos em aves, são denominadas APEC (*Avian Pathogenic Escherichia coli*) (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999), podendo atuar como agente primário ou secundário de infecção e causar doenças localizadas ou sistêmicas, conhecidas como colibacilose (Barnes e Gross, 1997). A colisepticemia, causada pela linhagem em estudo, SEPT362 (de Pace *et al.*, 2010, 2011), tem por característica a inflamação dos sacos aéreos seguida de septicemia, causando pericardite e perihepatite, com a falência de múltiplos órgãos (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Em APEC, apesar do grande número de fatores de virulência, incluindo adesinas e sistemas de secreção, muitos outros fatores não conhecidos podem existir e participar do processo de patogenicidade, os quais podem ser significativos para o desenvolvimento de medidas de controle de processos infecciosos.

A adesão e a invasão são passos importantes para a patogenicidade de muitas bactérias, incluindo a *E. coli*, pois permite que estas sobrepujem as defesas do hospedeiro (Meyer, Mintz e Fives-Taylor, 1997; Niemann, Schubert e Heinz, 2004). Sendo assim, a identificação e a caracterização de novos fatores de virulência, como adesinas e invasinas, relacionados com essas características tornam-se importantes para o entendimento do processo infeccioso da linhagem APEC.

Além dos diversos fatores de virulência, demonstrou-se que diferentes tipos de sinais extracelulares, que medeiam a comunicação entre bactérias, regulam a expressão gênica,

inclusive de genes relacionados à patogenicidade. Os sistemas *quorum sensing* (*QS*) bacterianos, mecanismo de sinalização dependente da densidade celular bacteriana, são de interesse significativo, particularmente nas áreas de interações patógeno-hospedeiro em medicina veterinária e humana, e em agricultura (Blackwell e Fuqua, 2011) e, pela primeira vez, o conhecimento da existência de sistemas de comunicação entre bactérias abre grandes possibilidades no estudo de mecanismos de patogenicidade complexos e possíveis meios de interferir nos mesmos

Neste contexto, neste trabalho, mutantes para os genes *ychO* (provável invasina), *luxS* (relacionado ao sistema *QS* autoindutor-2) e *qseC* (relacionado ao sistema *QS* autoindutor-3) foram construídos em uma linhagem de APEC (SEPT362) a fim de se estudar *in vivo* e *in vitro* o efeito destas mutações em características biológicas como, capacidades de adesão e invasão de linhagens celulares cultivadas *in vitro*, sobrevivência dentro de macrófagos, formação de biofilmes e motilidade, além da patogenicidade, apresentadas por esta linhagem.

2. Justificativa

A avicultura representa um importante segmento econômico no Brasil, e o sistema de criação de alta densidade faz com que este esteja sujeito a fatores que podem afetar, de maneira significativa, os seus rendimentos e custos. As linhagens de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) causam doenças localizadas, ou sistêmicas, em aves, conhecidas como colibacilose, e representam um agente significativo de morbidade e mortalidade para o setor. Em APEC, apesar do grande número de fatores de virulência, muitos outros fatores não conhecidos podem existir e participar do processo de patogenicidade, os quais podem ser significativos para o desenvolvimento de medidas de controle de processos infecciosos. Os resultados obtidos neste trabalho permitirão analisar uma possível invasina presente na linhagem APEC SEPT362, e alterações fenotípicas reguladas pelos sistemas *quorum sensing* autoindutor-2 e autoindutor-3 desta linhagem e poderão contribuir, significativamente, para a área revelando possíveis genes/proteínas que possam atuar como alvos terapêuticos.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. *Escherichia coli* Patogênica para Aves (APEC)

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae* que, tipicamente, coloniza o trato gastrointestinal de aves e de mamíferos (Drasar e Hill, 1974; Sojka e Carnaghan, 1961; Sojka, 1965). Esta apresenta diferentes grupos antigênicos caracterizados por diversas combinações do antígeno O (antígeno lipopolissacarídico somático constituinte da membrana externa), antígeno K (antígeno polissacarídico capsular) e antígeno H (antígeno protéico flagelar) (Wray e Woodward, 1994). Linhagens não patogênicas desta bactéria, geralmente, permanecem confinadas ao lúmen intestinal, porém, existem linhagens que podem causar infecções intestinais e em outros órgãos (Ron, 2006). Linhagens de *E. coli* patogênicas para aves são denominadas APEC (*Avian Pathogenic E. coli*) (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999) estando presentes na microbiota intestinal e superfícies mucosas de aves domésticas e selvagens podendo, também, ser isoladas do ambiente onde as aves se encontram causando, principalmente, infecções extraintestinais responsáveis por

perdas significativas na indústria aviária (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; La Ragione e Woodward, 2002). A maioria das linhagens APEC está associada a infecções extra-intestinais, sendo o termo colibacilose empregado para englobar o grande número de infecções existentes, dentre as quais: septicemia, celulite, pericardite, perihepatite, onfalite, peritonite, ooforite, infecções do trato respiratório e da gema dos ovos e síndrome da cabeça inchada (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

Em aves de postura e reprodutoras, APECs podem infectar o oviduto, via saco aéreo abdominal esquerdo, podendo levar à salpingite e à perda da capacidade de postura. Esporadicamente, APECs podem invadir a cavidade peritoneal, via oviduto, causando peritonite e morte. Em frangos e aves de postura, APEC pode causar uma síndrome específica denominada síndrome da cabeça inchada (SHS: *swollen head syndrom*) (Gross, 1991). Lesões observadas nessa síndrome incluem o edema gelatinoso da pele facial e dos tecidos periorbitais e, em alguns casos, no tecido subcutâneo e nas glândulas lacrimais (Droual e Woolcock, 1994; Gross, 1994). Em frangos e aves de postura, APECs também estão associadas à celulite que caracteriza-se como dermatite necrótica do abdome inferior e de coxas. Essas doenças não causam sinais clínicos e mortalidade, mas as lesões subcutâneas fibrosas associadas a elas resultam em perdas econômicas devido à condenação das carcaças (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

A doença mais importante associada à APEC, a septicemia, causada pela SEPT362, linhagem em estudo (de Pace *et al.*, 2010, 2011), tem como característica, lesões no trato respiratório, pericardite e perihepatite, que levam à falência de múltiplos órgãos e consequente morte da ave (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Gross, 1994). Lesões no trato respiratório incluem aerossaculite com exudato fibroso, infiltração inicial com heterófilos e uma subsequente predominância de fagócitos mononucleares (Barnes e Gross, 1997). Em infecções generalizadas, pericardite, perihepatite e panoftalmia também são observadas. Em aves adultas pode ocorrer septicemia aguda, podendo ser observadas pericardite, peritonite, necrose no fígado ou ausência de lesões.

Acredita-se que, exceto para as infecções da gema do ovo, todas estas infecções requeiram fatores predisponentes, que incluem condições ambientais e infecções primárias, principalmente virais, o que fariam com que estas amostras atuem como agentes patogênicos secundários (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999). As infecções respiratórias por APEC são,

geralmente, secundárias às infecções iniciais causadas pelo vírus da doença de *Newcastle*, pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas ou por *Mycoplasma gallisepticum*. A suscetibilidade das aves às APECs aumenta devido à desciliação das células do trato respiratório superior, causada pela exposição à amônia e poeira contaminada presentes no ambiente onde as aves se encontram (Gross, 1994).

Nos Estados Unidos da América e países Europeu, isolados APECs, comumente, pertencem a certos sorogrupos O, particularmente O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88 e O109, sendo os sorogrupos O1, O2 e O78 os mais freqüentemente associados à colibacilose aviária (Ewers *et al.*, 2004; Knöbl *et al.*, 2001; McPeake, Smyth e Ball, 2005; Ngeleka *et al.*, 2002). Entretanto, muitos isolados não tipáveis (NT) e outros que não pertencem aos sorogrupos identificados como patogênicos também já foram isolados nestes países e no Brasil (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Dias da Silveira *et al.*, 2002; McPeake, Smyth e Ball, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

Vários fatores de virulência já foram identificados em APEC. Estes fatores incluem a capacidade de produção de adesinas (fímbrias do tipo 1, P e *curl*) (Collinson *et al.*, 1993; Dozois, Pourbakhsh e Fairbrother, 1995; Ewers *et al.*, 2004; Janßen *et al.*, 2001; Knöbl *et al.*, 2001; Marc e Acn, 1998; McPeake, Smyth e Ball, 2005; de Pace *et al.*, 2010; Pourbakhsh *et al.*, 1997; Stordeur *et al.*, 2002; Wooley *et al.*, 1998), sistemas de aquisição de ferro (*iroBCDE*, o *operon* aerobactina e o *operon* yersiniabactina) (Dozois, Daigle e Curtiss, 2003; Janßen *et al.*, 2001), produção de toxinas com efeitos citopáticos (*stx* e *vat*) (Parreira e Gyles, 2002, 2003), resistência às defesas imunológicas do hospedeiro e sistemas de secreção (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Ewers *et al.*, 2007; de Pace *et al.*, 2010; La Ragione e Woodward, 2002), porém, ainda não se estabeleceram genes de patogenicidade específicos comuns a todas as linhagens. Linhagens APEC podem causar diferentes doenças, porém nenhum conjunto específico de fatores de virulência associado ao fenótipo patogênico de APEC foi descrito (Kaper, Nataro e Mobley, 2004). Muitas ilhas genômicas já foram identificadas e caracterizadas em algumas linhagens de *Escherichia coli*. Em *E. coli* humana enteropatogênica (EPEC - *Enteropathogenic Escherichia coli*) a ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), está presente, conferindo o fenótipo enteropatogênico às linhagens; em *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC - *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*) além da mesma ilha LEE, o

gene codificador da toxina shiga (*shiga-toxin*) está presente, conferindo o fenótipo entero-hemorrágico à linhagem. Em APEC, pelo menos duas ilhas de patogenicidade já foram identificadas (Kariyawasam, Johnson e Nolan, 2006; Parreira e Gyles, 2003), mas as mesmas não parecem constituir uma característica de todas as linhagens APEC.

3.2. Invasinas

Adesão e invasão a células hospedeiras são importantes passos na patogenicidade de muitas bactérias (Meyer, Mintz e Fives-Taylor, 1997). A adesão bacteriana é mediada por adesinas que reconhecem receptores na superfície celular. As bactérias que invadem as células hospedeiras possuem uma grande vantagem na patogenicidade, sobrepujando a resposta imune humoral (Niemann, Schubert e Heinz, 2004). Uma grande família de proteínas de membrana facilita a entrada de patógenos nas células hospedeiras por permitir forte aderência e invasão das células. Essa família de proteínas interage com receptores presentes na superfície celular, desencadeando uma cascata de sinais para rearranjar o citoesqueleto celular e induzir a captura bacteriana (Isberg e Leong, 1990). Os dois primeiros membros desta família são a intimina e a invasina, as quais, apesar de agirem de maneira diferente para promover a invasão em células hospedeiras, apresentam sequências significativamente similares, especialmente na região amino terminal (Isberg, Voorhis e Falkow, 1987; Jerse *et al.*, 1990). A primeira invasina (*inv*) a ser descrita, produzida pelas bactérias *Yersinia pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* (Isberg, Voorhis e Falkow, 1987), medeia a entrada bacteriana em células eucarióticas por ligação de alta afinidade aos membros da família de integinas β_1 (Grassl *et al.*, 2003; Isberg e Leong, 1990), proteínas heterodímeras de membrana responsáveis pela comunicação entre o ambiente extracelular e o citoesqueleto (Hynes, 1992). Essa interação ativa a reorganização do citoesqueleto do hospedeiro para envolver a bactéria (Nhieu *et al.*, 1996). As intiminas, que levam a lesões do tipo *attaching* e *effacing*, são produzidas por EHEC e EPEC (Frankel *et al.*, 1994; Jerse *et al.*, 1990). Em contraste com a invasina, o receptor da ligação da intimina é o Tir (*Translocated Intimin Receptor*), uma proteína secretada pela própria bactéria para dentro da célula hospedeira (Frankel *et al.*, 1998). As intiminas e invasinas apresentam estruturas de domínios similares: uma sequência de sinal N-terminal, um domínio β -barrel conservado, e um domínio de passagem C-terminal (a parte transportada da proteína) (Fairman *et al.*, 2012). A

estrutura β -barrel é necessária para o domínio de passagem, responsável por interações com as células hospedeiras e por ultrapassar sua membrana (Touzé *et al.*, 2004).

Através de análises *in silico* de genomas recém-sequenciados de linhagens APEC pertencentes ao Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, DGEB (Rojas *et al.*, 2013), foi possível a identificação de uma provável invasina, homóloga ao gene *ychO* da *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 (98% de identidade) e presente em 120 linhagens *E. coli* sequenciadas (NCBI). O papel desta proteína ainda não está estabelecido em nenhuma dessas linhagens e nem em APEC, e considerando a importância de proteínas do tipo intimina/invasina em outros patógenos gram-negativos, o papel desta foi investigado no presente trabalho.

3.3. *Quorum sensing*

Diferentes tipos de sinais extracelulares regulam a expressão gênica em bactérias, inclusive de genes relacionados à patogenicidade. O processo de comunicação via sinalização entre bactérias é chamado de *quorum sensing* (*QS*) e permite que a bactéria sincronize seu comportamento em uma escala populacional, pela regulação de diversas funções, incluindo virulência (Miller e Bassler, 2001). *QS* é um mecanismo de sinalização entre bactérias, dependente da densidade celular bacteriana e que as permitem agir como complexos multicelulares, aumentando suas chances de sobrevivência no meio ambiente, ou promovendo processos infecciosos em seus hospedeiros. Este mecanismo de comunicação entre células envolve a produção, a liberação e o reconhecimento dos autoindutores que são capazes de regular a expressão gênica (Fuqua, Winans e Greenberg, 1994) e permite que a população coordene o controle da expressão gênica de toda a comunidade (Kaper e Sperandio, 2005; Schauder e Bassler, 2001). Este sistema foi inicialmente caracterizado em *Vibrio fischeri* (Nealson e Hastings, 1979; Nealson, Platt e Hastings, 1970), uma bactéria Gram-negativa marinha que vive em associações simbióticas com diversos animais marinhos hospedeiros, cuja bioluminescência é regulada por *QS*. A detecção das moléculas autoindutoras produzidas por *E. coli* foram, inicialmente, descritas devido à capacidade dessas moléculas de ativar um dos dois sistemas de *QS* em *Vibrio harveyi*, o autoindutor 2 (AI-2) (Surette e Bassler, 1998) sendo, posteriormente, identificados os genes ativados pela presença de autoindutores (Baca-DeLancey *et al.*, 1999). Desde sua descrição, o sistema *QS* tem sido reconhecido por regular um grande número de

atividades em diversas espécies bacterianas como a produção de biofilme e expressão de genes de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* (Passador *et al.*, 1993) e a virulência em inúmeros patógenos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* (de Kievit e Iglewski, 2000).

Atualmente, quatro sistemas *quorum sensing* mediados por autoindutores estão bem descritos: (i) oligopeptídeos são predominantemente utilizados como autoindutores na sinalização entre bactérias Gram-positivas; (ii) as moléculas Acyl-Homoceryl-Lactonas (AHLs), pertencentes ao sistema autoindutor 1 (AI-1), são sinais espécie-específicos produzidos por bactérias gram-negativas (Reading e Sperandio, 2006); (iii) o sistema autoindutor 2 (AI-2), ou sistema *LuxS*, proposto como um sistema de comunicação universal e presente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Bassler, Greenberg e Stevens, 1997; Surette e Bassler, 1998), é a forma descrita como predominante de comunicação em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Bassler e Losick, 2006; Kaper e Sperandio, 2005); e, (iv) Sperandio *et al.* (2003) demonstraram a existência de uma molécula sinalizadora de *QS*, o autoindutor 3 (AI-3), que regula o sistema de dois componentes *QseBC* (genes *qseC* e *qseB*), abrindo novas perspectivas de estudos de circuitos gênicos de patogenicidade.

No presente trabalho, trabalhamos apenas com os sistemas autoindutores 2 e 3, uma vez que os oligopeptídeos não são produzidos por bactérias Gram-negativas, e que a bactéria em estudo apresenta apenas o sistema detector do autoindutor-1, o que torna necessária a presença de outras bactérias ou de Acyl-Homoceryl-Lactonas nos ensaios de caracterização.

3.3.1. Sistema AI-2

A molécula sinalizadora do sistema AI-2 é produzida pela ação do gene *luxS*, que codifica a enzima S-ribosil-homocisteinase, também conhecida como *LuxS* ou AI-2 sintetase (Bodor *et al.*, 2008). Essa enzima participa do Ciclo do Metil Ativado (CMA), que transforma a homocisteína em metionina. O precursor da biossíntese de AI-2 é a S-adenosil-metionina (SAM), composto essencial ao metabolismo central funcionando como doador de radicais metila. O processo ocorre através de três etapas (Figura 1) (Lebeer *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2006; Lowery, Dickerson e Janda, 2008; Schauder e Bassler, 2001; Vendeville *et al.*, 2005): (i) S-adenosil-metionina (SAM) é transformada em S-adenosil-homocisteína (SAH) por reações

metiltransferase; (ii) a adenina da SAH é removida pela enzima 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase (Pfs), gerando adenina e S-ribosil homocisteína (SRH); (iii) a enzima LuxS converte SRH, por transferência do grupo metil, em homocisteína e 4,5-diidroxil-2,3-pentanediona (DPD). DPD é muito instável e reage espontaneamente com água formando diferentes furanonas, conhecidas coletivamente como AI-2.

E. coli apresenta uma via de regulação denominada Lsr (LuxS-regulated), pela qual o AI-2 é detectado, internalizado e controla a expressão de vários genes (González Barrios *et al.*, 2006; Xavier e Bassler, 2005). Os genes da via Lsr foram identificados em diversas *Enterobacteriaceae*, porém ainda não está totalmente claro quando, nem como, seus sistemas de sinais são expressos (Rezzonico, Smits e Duffy, 2012). O AI-2, quando alcança nível crítico no meio extracelular, é detectado pelas células bacterianas ligando-se à proteína periplasmática LsrB (Miller *et al.*, 2004), sendo internalizado pela proteína transportadora dependente de ATP, LsrA, e pelas permeases LsrC e LsrD (Figura 2). O AI-2 intracelular é fosforilado pela quinase LsrK produzindo a forma fosforilada do sinal (P-AI-2) que se liga ao repressor LsrR, aumentando a transcrição do operon *lsr* (Figura 2) e, por consequência, há um aumento na internalização do AI-2 (Li *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2012; Xavier e Bassler, 2005). As proteínas LsrF e LsrG também são expressas pelo operon *lsr* e são requeridas para processamento posterior do P-AI-2 intracelular.

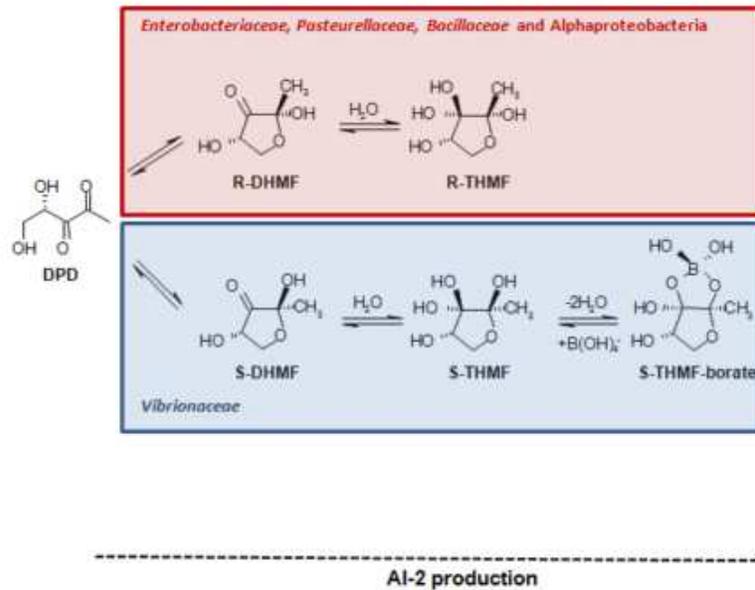
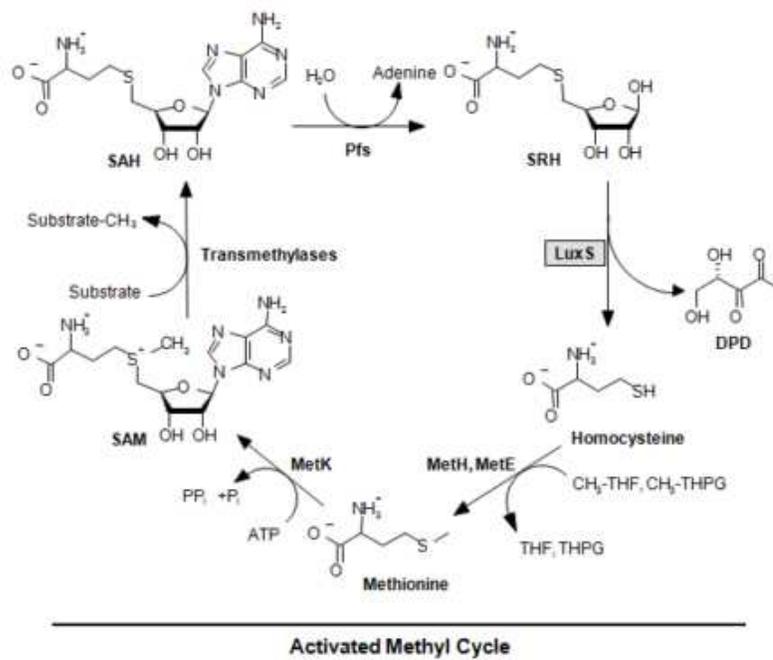


Figura 1 – Esquema de produção do AI-2. (Adaptado de Rezzonico, Smits e Duffy, 2012)

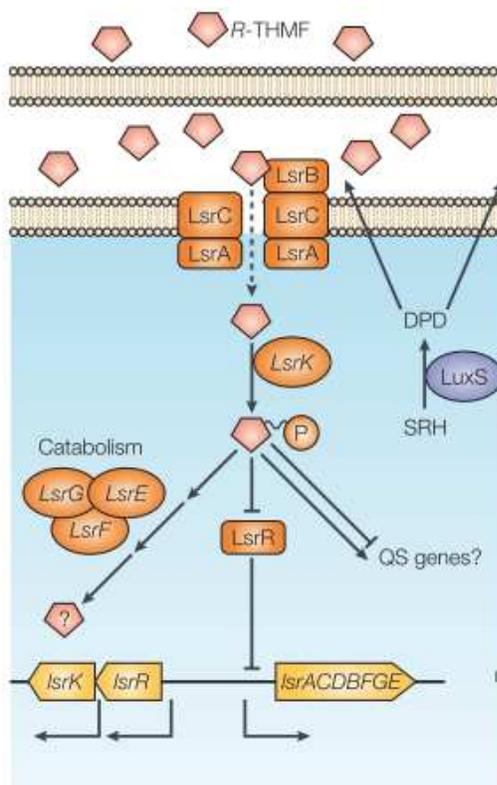


Figura 2 – Via de regulação LsR: detecção e internalização de AI-2. (Adaptado de Vendeville *et al.*, 2005)

Genes potencialmente regulados por AI-2 foram identificados em algumas linhagens através da construção de mutantes *luxS*, comparando-se a expressão gênica na cepa selvagem e na cepa mutante. Dentre as funções alteradas estão a divisão celular, o processamento de DNA, a virulência, formação de biofilme e motilidade (Balestrino *et al.*, 2005; DeLisa, Valdes e Bentley, 2001; Delisa *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2004; Sperandio *et al.*, 2001; Walters, Sircili e Sperandio, 2006). Porém, existem algumas controvérsias se a origem da regulação dessas funções se dão devido à falta do AI-2 ou a uma alteração no ciclo metil ativado.

Em *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7, os fenótipos e funções descritas como sendo afetadas pela mutação *luxS* são a expressão do sistema de secreção do tipo III (TTSS) e a expressão de flagelo (Sperandio *et al.*, 2001). EHEC e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) interagem com o epitélio intestinal causando lesões que são resultantes da presença do sistema de secreção do tipo III, codificado por uma ilha de patogenicidade chamada região LEE, controlada

Porém, ensaios com o mutante *luxS* na presença do AI-2 mostraram um ganho de 62 fenótipos, sendo a maioria relacionado à habilidade em utilizar diferentes fontes de carbono, nitrogênio e fosfatos, quando comparado ao mesmo sem o AI-2 (Walters, Sircili e Sperandio, 2006). Destes 62, 22 são os mesmos perdidos pela linhagem mutante quando comparada à selvagem, mostrando genes potencialmente regulados por este sistema. A mutação também resultou no aparecimento de alguns fenótipos que são perdidos na presença do AI-2, sendo estes relacionados à resistência a antibióticos (Walters, Sircili e Sperandio, 2006). Wang *et al.* (2012), através de ensaios com expressão de SAH e LuxS em mutantes *luxS* puderam confirmar que a formação de biofilme, a expressão de flagelos e genes de motilidade são regulados pelo sistema QS AI-2, em *E. coli* K-12.

Em estudos com APEC, Han *et al.* (2012) demonstraram que mutação no gene *luxS* de uma linhagem APEC isolada de um pato com sinais clínicos de septicemia resulta em diminuição da patogenicidade, sobrevivência *in vivo* e adesão e invasão de linhagens celulares cultivadas *in vitro*. Palaniyandi *et al.* (2013) construíram um mutante *luxS* para a linhagem APEC 078:K80:H9 e verificaram uma redução na invasão de órgãos internos e na letalidade de embriões de galinha, sobrevivência em macrófagos e invasão em fibroblasto de embriões de galinha, além de alteração na produção de lipopolossacarídeos (LPS).

3.3.2. Sistema AI-3

O sistema autoindutor 3 (AI-3), ou QseBC, é um sistema de sinal bacteriano mediado pelo AI-3 e controlado pelo sistema de dois componentes QseBC, sendo o QseB um regulador de resposta e o QseC, um sensor quinase (Sperandio, Torres e Kaper, 2002). Análises de mutantes mostraram que AI-3 afeta a expressão gênica de *E. coli* através deste sistema (Clarke *et al.*, 2006; Sperandio *et al.*, 2003). Além do AI-3, produzido pela microbiota intestinal, o QseC também funciona como um receptor dos hormônios catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, produzidos pelo hospedeiro, possibilitando uma via de comunicação entre eucariotos e bactéria (Clarke *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2009).

Além do QseBC, reguladores múltiplos estão envolvidos no controle de expressão de genes de virulência. Um segundo sistema de regulação de dois componentes, a histidina quinase, QseE, e o regulador de resposta, QseF, que controlam a formação de lesões *attachement and*

effecement (A/E) em EHEC foi descrito por Reading *et al.* (2009). Este sistema controla a translocação de efetores do sistema de secreção do tipo III em células hospedeiras, através do gene *qseG*, que fica no mesmo operon do *qseEF* (Reading *et al.*, 2009). Além desses dois sistemas de dois componentes, dois reguladores tipo LysR, o QseA e o QseD, também são necessários para o controle da expressão de LEE, revelando que uma complexa cascata regulatória liga o *quorum sensing* e a expressão de genes de virulência em *E. coli* (Sperandio, Li e Kaper, 2002; Walters, Sircili e Sperandio, 2006).

As histidinas quinases agem em conjunto com uma proteína reguladora de resposta (RR), que, normalmente, é um fator de transcrição, constituindo um sistema de dois componentes (Stock, Robinson e Goudreau, 2000). Na presença de AI-3, ou catecolaminas, o QseC tem sua fosforilação aumentada. O QseC ativado transfere o fosfato, não apenas ao seu cognato RR, o QseB, mas também para outros dois RRs: o KdpE e o QseF (Figura 4) (Clarke *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2009). O QseB, em EHEC, em *E. coli* uropatogênica (UPEC) e em *E. coli* K-12, regula o flagelo e genes de motilidade através de sua ligação direta à região promotora do *flhDC*, o maior regulador do regulon flagelar (Clarke e Sperandio, 2005; Sperandio, Torres e Kaper, 2002). Em UPEC foi demonstrado que o QseB também influencia na expressão da fímbria do tipo 1, do *csgA* e de outros (Kostakioti *et al.*, 2009). QseB liga-se a diferentes sítios nos promotores alvos de acordo com seu grau de fosforilação, o que permite uma modulação da expressão gênica pelo arranjo espacial destes sítios na região reguladora de genes, permitindo que o mesmo RR possa reprimir e ativar a transcrição do mesmo gene (Hughes *et al.*, 2009). Na forma não ativada (não-fosforilada), QseB forma uma barreira de regulação adicional para a expressão de *flhDC*. Apenas sob condições em que QseB está fosforilada e em concentração suficiente, há ativação completa da regulação de flagelos (Hughes *et al.*, 2009). O KdpE controla a captura de potássio e a osmolaridade, e ativa a expressão do gene *ler*, e conseqüentemente todos os genes LEE (Hughes *et al.*, 2009; McDaniel *et al.*, 1995; Nakashima *et al.*, 1992). O QseF tem papel na produção da toxina Shiga e na expressão de genes relacionados ao estresse (Hughes *et al.*, 2009; Lyte e Arulanandam, 1996; Lyte *et al.*, 1997; Reading *et al.*, 2007; Sperandio *et al.*, 2003; Sperandio, Torres e Kaper, 2002).

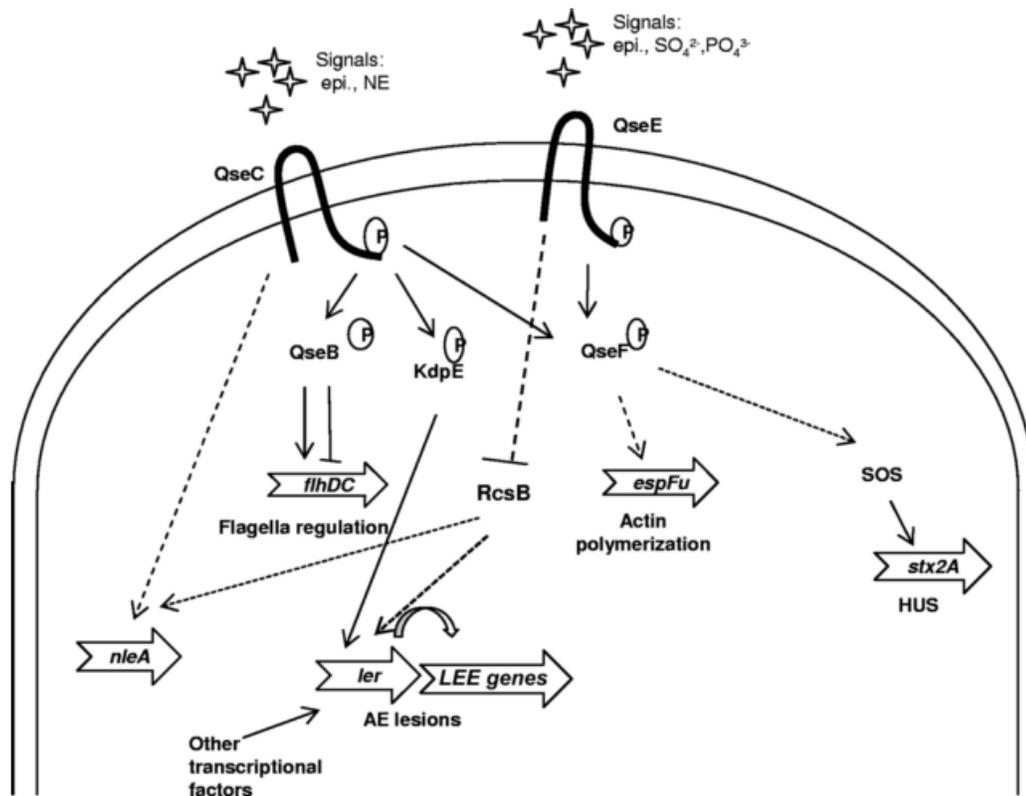


Figura 4 – Modelo da cascata de sinalização do QseC em EHEC. (Njoroge e Sperandio, 2012)

O sub-patotipo EHEC, provavelmente, encontra primeiro o sinal AI-3 produzido pela flora microbiana. Após perceber o AI-3, QseC inicia a cascata de sinalização que irá ativar o regulon flagelar, levando à motilidade do tipo *swimming*, o que faz com que a EHEC se aproxime da parede intestinal epitelial. Conforme se aproxima do epitélio, e é exposta à adrenalina e à noradrenalina, começa a formar lesões A/E (Hughes *et al.*, 2009). Njoroge e Sperandio (2012) mostraram que a adrenalina aumenta a habilidade da EHEC O157 de infectar células HeLa e formar pedestais, corroborando o proposto por Hughes *et al.* (2009).

Como o sistema de *quorum sensing* AI-3 controla a expressão de múltiplos genes envolvidos na patogenicidade de *E. coli* sua importância foi testada para a patogenicidade *in vivo*. Clarke *et al.* (2006), utilizando coelho como modelo verificaram que o mutante *qseC* atenua a infecção. A deleção do *qseC* atenua a virulência não só de EHEC e UPEC, mas também de *Salmonella enterica Typhimurium*, *Francisella tularensis* e *Edwardsiella tarda*, *in vitro* e *in vivo* (Bearson e Bearson, 2008; Kostakioti *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2007).

3.3.3. *Quorum quenching*

Os mecanismos de sinalização bacteriana são de interesse significativo, particularmente na área de interação patógeno-hospedeiro em medicina veterinária, medicina humana e na agricultura (Blackwell e Fuqua, 2011). O conhecimento da existência de sistemas de comunicação entre bactérias, levando à expressão coordenada de grupos gênicos (ligando, desligando, ou modulando), abre grandes possibilidades no estudo de mecanismos de patogenicidade complexos e possíveis meios de interferir nos mesmos. Assim, embora os sistemas *QS* sejam usados por muitos patógenos bacterianos para a regulação da virulência, os mesmos não são essenciais à sobrevivência. A descoberta de um amplo espectro de microrganismos que utilizam *QS* para, em determinadas condições, controlar sua virulência, revelou um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas (Galloway *et al.*, 2010). Assim, o processo chamado de *quorum quenching*, que age bloqueando sistemas *QS* pode, potencialmente, transformar organismos patogênicos em organismos não virulentos sem impor o nível de pressão seletiva associada ao uso de tratamentos antibacterianos (Galloway *et al.*, 2010; de Kievit e Iglewski, 2000). Existem estratégias para prevenir a comunicação pelos sistemas AI-2 e AI-3 entre patógenos, incluindo *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Vibrio Cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Para isso, são utilizados diferentes alvos: enzimas geradoras da molécula sinal, a própria molécula sinal, ou os componentes do processo de transdução de sinal (Ganin, Tang e Meijler, 2009; Han *et al.*, 2008; Janssens *et al.*, 2008; Rasko *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2006; Widmer *et al.*, 2007). Alfaro *et al.* (2004) produziram dois análogos do substrato do LuxS que funcionam como inibidores e sondas da sinalização mediada por AI-2. Clarke *et al.* (2006) demonstraram que o QseC liga-se diretamente ao AI-3 e aos hormônios adrenalina e noradrenalina, e que essa ligação pode ser bloqueada pelo antagonista adrenérgico pentalomina (PE). Rasko *et al.* (2008) identificaram uma molécula, a LED209, que inibe *in vitro* e *in vivo* a autofosforilação do QseC.

Como este controle é muito complexo, o melhor entendimento da complexidade dessas cascatas de sinais podem contribuir para o desenvolvimentos de novas terapias antivirulência e abrir a possibilidade de construção de linhagens atenuadas que poderiam ser utilizadas em programas vacinais.

4. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi criar mutações nulas para os genes *ychO*, *luxS* e *qseC* existentes na linhagem patogênica APEC SEPT362, segundo a metodologia de *Lambda Red* descrita por Datsenko e Wanner (2000), com a finalidade de se estudar as alterações nas propriedades biológicas presentes na linhagem e seus efeitos na patogenicidade.

5. Material e Métodos

5.1. Linhagem bacteriana

A linhagem APEC SEPT362 (OR:H10) foi isolada do fígado de uma galinha poedeira com quadro clínico de septicemia e pertence à coleção bacteriana do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana (LBMB), do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Essa linhagem APEC apresenta resistência aos antibióticos Estreptomicina (100µg/ml), Ampicilina (100µg/ml) e Tetraciclina (50µg/ml) e já teve seu genoma sequenciado e todos os seus genes anotados (Rojas *et al.*, 2013).

5.2. Caracterização *in silico*

O Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>) foi utilizado para a anotação dos genes da linhagem APEC SEPT362. A análise deste genoma demonstrou a presença de um gene descrito como uma invasina “putativa” homóloga ao gene *ychO* da *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 (98% de identidade), presente no contig24, da base 40482 até a base 41735, ainda não caracterizado; do gene *luxS*, envolvido na produção do Autoindutor-2, presente no contig54, da base 23016 até a base 23531; e do gene *qseC*, um sensor do sistema Autoindutor-3, presente no contig60, da base 82241 até a base 83590. Previamente à escolha do gene *luxS*, a presença dos genes do operon *lsr*, necessários para percepção e internalização do autoindutor-2, foi verificada na referida linhagem. Os genes *ychO*, *luxS* e *qseC* foram re-anotados utilizando o RAST (*Rapid*

Annotation using Subsystem Technology) (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), para confirmar o tamanho dos genes e sua composição.

Uma predição topológica foi obtida para a proteína YchO, utilizando o servidor I-Tasser (Zhang, 2008). A representação dos domínios dessa proteína foi feita utilizando o *My Domains – Image Creator* (<http://prosite.expasy.org/mydomains/>).

5.3. Extração RNA

As culturas foram crescidas aerobiamente em meio LB, a 37°C por 18 h, e diluídas na proporção 1:100 em meios LB e DMEM. Após a diluição, foram crescidas em agitação (150rpm), a 37°C, até atingirem a OD₆₀₀ de 0,5. O RNA foi extraído utilizando-se o kit RNAeasy Mini Kit (QIAGEN), conforme o protocolo do fabricante.

5.4. Análises de expressão *in vivo* por qRT-PCR

A expressão dos genes *ychO*, *luxS* e *qseC*, em pulmão e baço de aves, foi verificada utilizando-se PCR em tempo real (qRT-PCR). Para isso, culturas de SEPT362 foram crescidas por 18 horas em meio LB a 37°C, lavadas e ressuspendidas em PBS esterilizado em uma concentração de 10⁸ UFC/ml, e inoculadas no saco aéreo direito de dez pintos (Cobb) de um dia de vida. Após 24 e 48 h, as aves sobreviventes foram sacrificadas e os pulmões e baços removidos, processados para extração do RNA, utilizando-se o kit RNAeasy Mini Kit (QIAGEN), conforme o protocolo do fabricante, e analisados por qRT-PCR.

5.5. 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 todos são apresentados na Tabela 1. 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 iniciador 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, Sircili e Sperandio, 2006). A coleção de dados foi analisada utilizando-se o programa Step One Software v.2.1 (Applied Biosystems®, EUA).

5.6. Construção do mutante

O mutante foi construído baseando-se na metodologia de *Lambda Red* descrita por Datsenko e Wanner (2000), com algumas modificações.

5.6.1. Inserção do cassete de cloranfenicol no plasmídio pKD46 (pKD46Cm) e transformação na linhagem SEPT362

O plasmídio pKD46, descrito por Datsenko e Wanner (2000), foi modificado antes de ser introduzido na bactéria na qual foi realizada a recombinação homóloga. A resistência original do plasmídio (ampicilina) é uma das resistências encontradas na linhagem SEPT362, o que dificultaria a seleção de bactérias receptoras do plasmídio pKD46. Para isso, o cassete de resistência ao antibiótico cloranfenicol foi amplificado, utilizando-se o plasmídio pKD3 como molde. Para isso, foi utilizada a enzima Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs), seguindo as instruções do fabricante. O termociclador foi programado com as seguintes condições: t1, 30 s a 98°C, t2, 10 s a 98°C, t3, 30 s a 50°C, t4, 1 min 30 s a 72°C, t2-t4, 30 ciclos repetidos, t5, 5 min a 72°C. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 2. Estes foram construídos com sítios de restrição para a enzima *XmnI*.

Tabela 1- Iniciadores utilizados para PCR em tempo real.

Gene	Sequências dos Iniciadores	
	Direto	Reverso
<i>ychO</i>	GCAGGGCGATACGCAGATA	CCTCCTCACTGTTGGCTTGTG
<i>luxS</i>	AGCGACACGCTGCTCATCT	TGCCGCACCGGTTTTTAT
<i>qseC</i>	TCAGGACGTCGCGGAGAT	CCATCACCGACGATTGCA
<i>rpoA</i>	GCGCTCATCTTCTTCCGA	CGCGGTCGTGGTTATGTG
<i>aatA</i>	CGCCTGGGAGCAAGAACA	AACCGCATACCGCGTATTTT
<i>aatB</i>	CGTTTGCTGGGCATCAGTT	CCCGTTATCAGAGCATGATCAA
<i>csgA</i>	TGGTAATGGTGCAGATGTTGG	ACGTTGGGTCAGATCGATTGA
<i>ipfA</i>	AGGCGCTTCTGTACCATCAAA	GTGCCCGGCAACCTACAC
<i>Ecp</i>	GCTACCGAGTGGCGTCACA	GGTCGGCAACAGCCAAAA
<i>fimH</i>	GATGCGGGCAACTCGATT	ACGCCCTGTGCAGGTGAA
<i>flgE</i>	CCTCAACTCCATGCAGCAAA	TTCTGGGTGGTTGCCACAA
<i>fliC</i>	GCCGTTGAACTGGGTCTGA	CAAATCCCGTCTCGACGAA
<i>motA</i>	AATATCGCGTTCCAGCGAAA	CGGTTGATGGCGAAATCG
<i>flhD</i>	TCTTGCGCAGCGCTTCT	GCTCTCAACTCGCTTGCTGAA

Tabela 2- Iniciadores para amplificação do cassete de cloranfenicol.

Sentido	Sequencia Iniciadores*
Direto	GAATTTTTTCGCTATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Reverso	GAATTTTTTCGCTATACATATGAATATCCTCCTTAG

*Em vermelho, sítios de restrição da enzima *XmnI*.

O plasmídio pKD46 e o cassete de cloranfenicol foram, então, digeridos com a enzima de restrição *XmnI*, para a qual o plasmídio possui um único sítio de restrição localizado logo após o promotor do gene *bla* (ampicilina), e purificados utilizando-se o PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen), segundo as indicações do fabricante. O cassete foi ligado ao plasmídio pKD46 utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Fermentas) através da seguinte reação: 5 µl do plasmídio digerido; 5 µl do inserto digerido; 1 µl de ligase; 2 µl de 10X buffer ligase e 7 µl de água. Os 20 µl finais de reação foram incubados a 22°C por 16 h e transformado, por eletroporação, na linhagem competente de *E. coli* DH10β. As linhagens receptoras do plasmídio foram crescidas em placas de LB contendo 20 µg/ml do antibiótico cloranfenicol. Uma colônia positiva (resistente ao cloranfenicol) foi selecionada e seu plasmídio extraído utilizando-se o QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), seguindo as especificações do fabricante. O plasmídio purificado foi, então, transformado, por eletroporação, na linhagem SEPT362. A presença do plasmídio pKD46Cm, nesta linhagem, foi confirmada através da extração de plasmídios e verificação em gel de agarose 0,8%. Colônias positivas foram crescidas em meio LB, acrescidas de *Hogness Freezing Media* na proporção 1:1, e estocadas (-80°C).

5.6.2. Iniciadores para construção de mutantes

Os iniciadores para mutagênese dos genes a serem estudados foram desenhados manualmente a partir do conhecimento das sequências de DNA laterais ao gene *ychO*, *luxS* e *qseC* (Rojas *et al.*, 2013). As sequências destes oligonucleotídeos são apresentadas na Tabela 3. Estes iniciadores possuem 70 bases, das quais 50 são homólogas à região adjacente ao gene alvo da deleção e atuam na recombinação homóloga, e 20 bases restantes são referentes ao cassete de canamicina do plasmídio pKD4 e utilizadas em sua amplificação.

Tabela 3 - Iniciadores para construção de mutantes para os genes *ychO*, *luxS* e *qseC*.

Gene	Sentido	Sequencias Iniciadores* ⁱ **
<i>ychO</i>	Direto	TATTCTTTAGGGCTATGGTTTTTCATTTTTTACCGGAAG TTACCGACGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	Inverso	AGTCTCGCGTGGAAGCTGCGGTATGGGTGCATCAGGA GCGCATTTTCTGACATATGAATATCCTCCTTAG
<i>luxS</i>	Direto	AGTTCATTTGAACTGGCTTTTTTCAATTAATTGTGAAGA TAGTTTACTGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	Inverso	GGGAAGAAAGAGTTCAGAAAATTTTTAAAAAATTAC CGGAGGTGGCTAACATATGAATATCCTCCTTAG
<i>qseC</i>	Direto	AGTGATTTTATTCGTACCGTGCATGGTATTGGCTACACA TTAGGTGAGAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	Inverso	AATTAGCAAATGTGCAAAGTCTTTTGCGAATTTAGCA AAAATCTTACCCCATATGAATATCCTCCTTAG

*Em preto, 50 bases homólogas às regiões adjacentes ao gene alvo da deleção.

**Em vermelho, 20 bases referentes à amplificação do cassete de canamicina.

5.6.3. Construção do Inseto

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se o plasmídio pKD4 como molde para a amplificação do cassete de canamicina que foi inserido no local do gene deletado. A enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) foi utilizada segundo as instruções do fabricante (10 µl Phusion HF Buffer 5X; 31 µl de água ultra pura; 1 µl de DNTP mix (10mM); 0,5µl Phusion DNA Polymerase; 2,5 µl de cada iniciador (10µM) e 1,0 µl da solução de pKD4). O termociclador foi programado com as seguintes condições: t1, 30 s a 98°C, t2, 10 s a 98°C, t3, 30 s a 50°C, t4, 1,5 min a 72°C, t2-t4, 30 ciclos repetidos, t5, 5 min a 72°C. Após a confirmação do tamanho do inserto de 1,6 kb, os 245µl de produto da amplificação foram precipitados utilizando-se a técnica do cloreto de sódio 5M (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989). Aos 245µl de produto de PCR foram acrescentados 8µl de cloreto de sódio 5M e 800µL de etanol

absoluto gelado e, após a homogeneização por inversão, incubou-se a -20°C por 20 min. A mistura foi, então, centrifugada em micro centrífuga refrigerada a 12.000 r.p.m. por 10 min. O DNA precipitado foi lavado 3 vezes com 1 ml de etanol 70% (12.000 r.p.m. – 2 min), e o tubo contendo o sedimento, após o descarte do sobrenadante, permaneceu por 5 min em estufa a 37°C para evaporação do etanol restante. Em seguida ressuspendeu-se o DNA em 10 μl de água ultrapura.

5.6.4. Eletroporação do Inseto

Uma cultura da linhagem SEPT362 apresentando o plasmídio pKD46Cm foi preparada em caldo LB contendo 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Ampicilina, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Tetraciclina, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Estreptomicina e 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de Cloranfenicol, e incubada a 29°C por 18 horas. Um volume de 850 μL dessa cultura foi transferido para 20 ml de caldo LB fresco com Cloranfenicol 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 5 ml de L-arabinose 1M. A cultura foi incubada a 29°C em agitação (150 r.p.m.), e quando em D.O. 0,5, um volume adicional de 5 ml de L-arabinose 1M foi acrescentado à cultura, que permaneceu por mais 40 min a 29°C em agitação (150 r.p.m.). A cultura foi, então, centrifugada a 4000 r.p.m. por 15 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado três vezes em água destilada autoclavada gelada (4000 r.p.m. por 15 min, a 4°C). Após a última lavagem, o sedimento foi eluído em aproximadamente 80 μl de água gelada, misturado aos 10 μl do inseto purificado e concentrado, depositado em cubeta de 0,2 cm para eletroporação. A amostra foi submetida ao eletroporador Bio Rad calibrado com 2,5 Kv de voltagem, 200 Ohms de resistência e 25 μFD de capacitância. Imediatamente após o pulso elétrico, foram adicionados 1,5 ml de caldo LB à temperatura ambiente à cubeta. A amostra foi, em seguida, incubada a 37°C por 1 h 30 min e crescida durante à noite à temperatura ambiente. A seguir, a cultura foi centrifugada a 12.000 g por 2 min, e o precipitado eluído em 100 μl PBS pH 7,4 e semeada em LB-Ágar contendo 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Canamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

5.6.5. Seleção e confirmação do mutante

Colônias canamicina resistentes, isoladas, foram ressemeadas em MacConkey-Ágar contendo 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de canamicina e incubadas a 37°C por 24 h, com posterior novo crescimento

em LB-Ágar contendo 50 µg/ml de canamicina. Em seguida, reações de PCR foram realizadas para a confirmação da recombinação homóloga entre o cassete de resistência ao antibiótico e o gene alvo. Para isso, duas reações diferentes foram utilizadas, uma com iniciadores internos ao gene e outra com iniciadores externos. Os iniciadores utilizados estão apresentados na Tabela 4. As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 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 (25 mM); 0,5 µl de cada iniciador (10µM) e 1 colônia. O termociclador foi programado com as seguintes condições: t1, 3min a 95°C, t2, 20 s a 95°C, t3, 1 min a 55-60°C, t4, 1 min 30 s a 72°C, t2-t4, 25 ciclos repetidos, t5, 5 min a 72°C. Os mutantes foram confirmados em gel de agarose 1%. Colônias positivas foram crescidas em meio LB, acrescidas de *Hogness Freezing Media* na proporção 1:1, e estocadas (-80°C).

Tabela 4 - Iniciadores para confirmação da deleção dos genes *ychO*, *luxS* e *qseC*.

Gene	Localização em relação ao gene	Sentido	Sequência do Iniciador
<i>ychO</i>	Externos	Direto	TACCGGAAGTTACCGACGTT
		Inverso	ATCAGGAGCGCATTTTCTGA
<i>luxS</i>	Externos	Direto	AGTTCATTTGAACTGGCTTTTTT
		Inverso	AAATTACCGGAGGTGGCTAA
	Internos	Direto	CTAAATGTGCAGTTCCTGCAACT
		Inverso	ATGCCGTTGTTAGATAGCTTCAC
<i>qseC</i>	Externos	Direto	AGTGATTTTATTCGTACCGT
		Inverso	ATTTAGCAAAAATCTTACCC
	Internos	Direto	ATGAAATTTACCCAACGTCTTAGTCT
		Inverso	TTACCAGCTTACCTTCGTCTCAA

5.7. Construção da linhagem complementada

O complemento do mutante $\Delta ychO$ foi construído utilizando o vetor de clonagem pACYC184, e o gene *ychO*, amplificado juntamente com seu promotor a partir do DNA genômico da linhagem SEPT362, sendo inserido entre os sítios de restrição *SalI* e *BamHI*. Os iniciadores utilizados para a amplificação estão descritos na tabela 4. No iniciador direto foi inserida a sequência de restrição para a enzima *SalI* e no iniciador inverso, a sequência para a enzima *BamHI*. O produto da amplificação foi purificado utilizando-se o PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen), seguindo-se o protocolo do fabricante.

Para a complementação do mutante $\Delta luxS$, o mesmo vetor foi utilizado e o gene *luxS* também foi amplificado juntamente com seu promotor a partir do DNA genômico da linhagem SEPT362, sendo inserido entre os sítios de restrição *SalI* e *BspHI*, inativando a marca de resistência ao antibiótico Tetraciclina. Os iniciadores utilizados para a amplificação estão descritos na Tabela 5. No iniciador direto foi inserida a sequência de restrição para a enzima *SalI* e no iniciador inverso, a sequência para a enzima *BspHI*. Para a complementação do mutante $\Delta qseC$, o mesmo vetor foi utilizado, porém o promotor utilizado para expressão foi o promotor do gene de resistência à tetraciclina, presente no plasmídeo pACYC184. Os iniciadores utilizados para a amplificação estão descritos na Tabela 5. No iniciador direto foi inserida a sequência de restrição para a enzima *HindIII* e no iniciador inverso, a sequência para a enzima *BamHI*.

Os fragmentos amplificados e o vetor plasmidial pACYC184 foram, duplamente, digeridos pelas enzimas de restrição (Fermentas), a 37°C por 1 hora, seguindo a seguinte reação: 1,5 µl de cada enzima; 20 µl de DNA; 5 µl de 1x FastDigest Buffer e 22 µl de água. 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 com o Kit PureLink PCR Purification (Invitrogen).

Tabela 5 - Iniciadores para construção dos complementados dos mutantes $\Delta ychO$, $\Delta luxS$ e $\Delta qseC$.

Gene	Sentido	Sequências dos Iniciadores*
<i>ychO</i>	Direto	GCTATAGTTCGACGCGAGAAAATACGACAAAAG
	Inverso	GTAAGGATCCACATGCTGAAGAAAATGAA
<i>luxS</i>	Direto	GCTATAGTTCGACCTAAATGTGCAGTTCCTGCAACT
	Inverso	GCTATATCATGAGAAGCCGCTGATACCGAAC
<i>qseC</i>	Direto	GTAAGCTTTAATGCATGAAATTTACCCAACGTCT
	Inverso	GTAAGGATCCGTCACAGAGCGGTACGGTGA

*Em vermelho, sítio de restrição da enzima *SalI*. Em azul, sítio de restrição da enzima *BamHI*. Em laranja, sítio de restrição da enzima *BspHI*. Em rosa, sítio de restrição da enzima *HindIII*. Em marrom, bases para manter o quadro de leitura. Em verde, *overhang* para ancoramento da enzima.

A reação de ligação foi realizada utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Fermentas), através da seguinte reação: 5 μ l do plasmídio digerido; 5 μ l do inserto digerido; 1 μ l de ligase; 2 μ l de 10X buffer Ligase e 7 μ l de água. Os 20 μ l finais de reação foram incubados a 22°C por 16 horas e transformados na linhagem competente de *E.coli* DH10 β . As linhagens receptoras do plasmídio foram crescidas em placas de LB contendo 20 μ g/ml do antibiótico cloranfenicol. Uma colônia positiva foi selecionada e seu plasmídio extraído utilizando-se o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) segundo as especificações do fabricante. A confirmação do complementado foi feita por amplificação, utilizando-se os iniciadores da construção do inserto e por comparação em gel de agarose 0,8%. O plasmídio purificado confirmado foi, então, eletroporado na linhagem mutante. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas de LB-Ágar suplementadas com o antibiótico cloranfenicol (20 μ g/ml). O complementado foi confirmado através da extração de plasmídios e verificação em gel de agarose 0,8%. Colônias positivas foram crescidas em meio LB, acrescidas de *Hogness Freezing Media* na proporção 1:1, e estocadas (-80°C).

5.8. Curva de crescimento

Culturas crescidas por 18 horas, 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.

5.9. Experimentos de Patogenicidade *in vivo*

Pré-inóculos das linhagens selvagem, mutante e complementada foram crescidos por 18 horas. Inóculo de 50 ml de cultura das linhagens selvagem, mutante e complementada foram preparadas em caldo LB, utilizando o pré-inóculo na proporção 1:100, e incubados a 37°C por 18 horas sob agitação (150 r.p.m.). As culturas foram centrifugadas a 4000 r.p.m. por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano lavado duas vezes em 10 ml de PBS pH 7,4 e ressuspenso em 5mL da mesma solução. A avaliação da mortalidade foi realizada em aves de corte da linhagem comercial Cobb, com um dia de vida, não vacinadas. Grupos de 20 aves foram inoculados pela via do saco aéreo direito com o auxílio de uma seringa de insulina, recebendo um total de 0,1 ml de um inóculo contendo 10¹⁰ UFC/ml. As aves foram observadas a cada 12 horas, até 07 dias após a inoculação, contabilizando-se a mortalidade. Ao fim do período de observação, os sobreviventes foram sacrificados, procedendo-se à necropsia e avaliação das lesões com a finalidade de se verificar se as mesmas eram compatíveis à doença causada pela linhagem em estudo. A taxa de mortalidade média das aves foi comparada pelo teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 5%, utilizando o programa GraphPad Software (2013). Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo "Comitê de Ética no Uso de Animais-CEUA Unicamp" (número de protocolo 2669-1(B)) de acordo com a Legislação Brasileira N ° 11794 (Anexos A e B).

5.10. Ensaio de motilidade do tipo *swimming*

Para esse ensaio, placas de *petri* contendo 30 ml de LB com 0,3% de Ágar foram utilizadas para o teste. Pontos determinados nas placas foram inoculados com auxílio de um estilete umedecido em cultura da linhagem SEPT362, da linhagem mutante e da complementada,

preparadas em caldo LB por 18 h a 37°C. As placas foram incubadas a 37° por 16 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).

5.11. 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).

5.12. 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 do análogo da manose, methyl-alpha-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 com 10% soro

fetal bovino (concentração final) até atingir a confluência. As células foram fixadas, gradativamente, com soluções de paraformaldeído 0,75%, 1,15% e 1,5%, com 30 min de incubação com cada solução. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS pH7,4 esterilizado e, em seguida, bloqueados utilizando 100 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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.

5.13. Ensaio de Invasão em células CEC-32 cultivadas *in vitro*

Os mutantes obtidos e a linhagem selvagem foram avaliados quanto às suas habilidades de invasão em células de fibroblasto aviárias (CEC-32) (Kaaen, Lange e Stiburek, 1982). As células 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 Gentamicina foi adicionado aos poços, e a placa incubada por 1 h a 37°C em 5% de CO₂. Após a incubação, um grupo de células foi lisado e plaqueado para contagem de suas bactérias. O outro grupo foi incubado por mais 1,5 h a 37°C em DMEM com 10% soro fetal bovino contendo 5 µg/ml de Gentamicina. Para a lise, o meio foi descartado e os poços lavados mais uma vez e a placa 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 LB-ágar

contendo o antibiótico ao qual a bactéria é resistente. O número de unidades formadoras de colônias foi determinado pela contagem de bactérias nas diferentes diluições. 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.

5.14. Ensaio de Sobrevivência em Macrófago

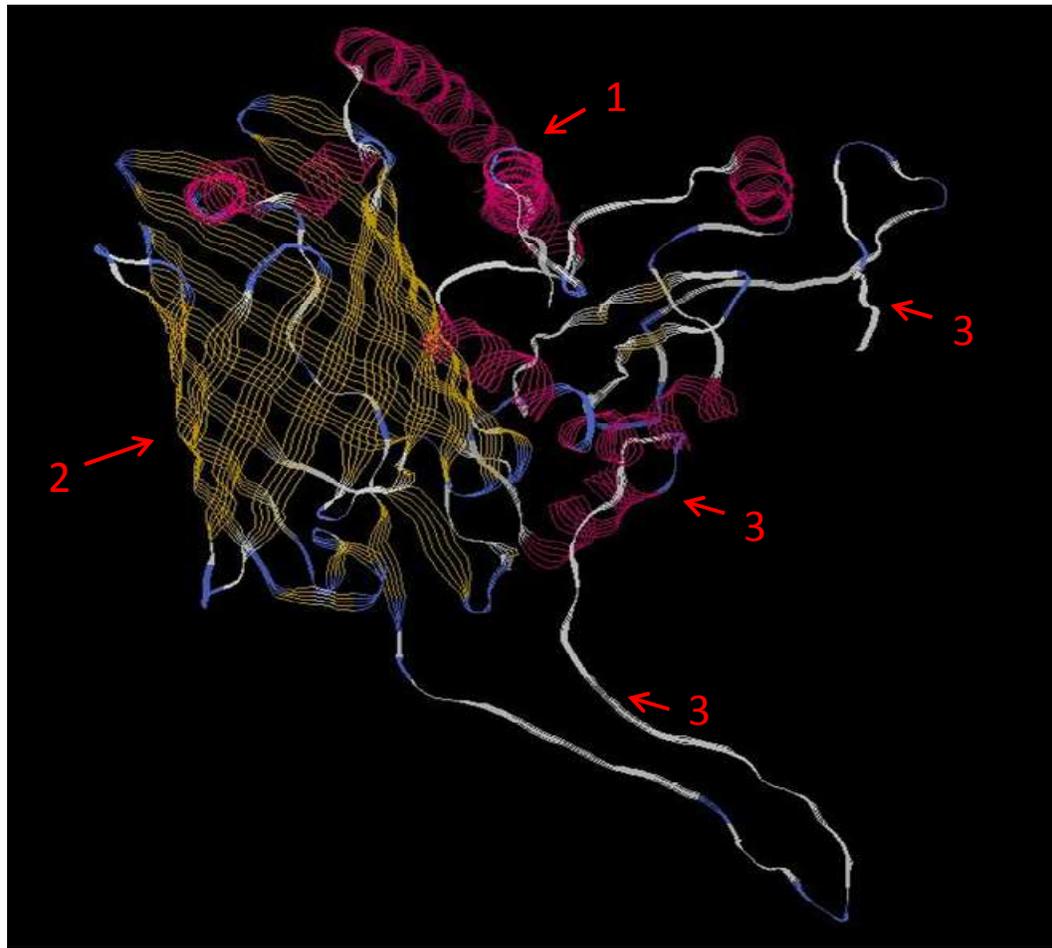
Neste ensaio, foi utilizada a linhagem de macrófago HD11 de galinhas transformadas com o vírus *Mielocytomatosis* (MC29) (Beug *et al.*, 1979). Para a infecção, os macrófagos foram cultivados por 18 h em placa de 24 poços, a $7,5 \times 10^4$ células/cm² em meio de infecção constituído de RPMI contendo 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 Gentamicina 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. Meio de infecção foi, novamente, adicionado (1 ml) 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 LB-Ágar contendo o antibiótico ao qual a bactéria era resistente. O número de unidades formadoras de colônias foi determinado pela contagem de bactérias nas diferentes diluições. 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.

6. Resultados

6.1. Análise *in silico*

A análise do genoma da linhagem APEC SEPT362 revelou a presença dos genes *ychO*, *luxS* e *qseC*. Para iniciar nosso trabalho, uma reanotação destes genes foi realizada utilizando o programa RAST. O gene da invasina “putativa” homóloga ao gene *ychO* da linhagem de *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 (98% de identidade) foi verificado estar presente em 120 linhagens *E. coli* sequenciadas (NCBI), porém, até agora, não foi caracterizada para nenhuma delas. Como resultado da reanotação do gene *ychO*, detectamos a presença de uma sequência de DNA correspondente a um peptídeo sinal de 141 pb que não estava presente na proteína GI:449323183 anotada no genoma da SEPT362, que constava do banco NCBI. Este peptídeo foi, então, considerado como parte do gene uma vez que esse sinal N-terminal é um importante domínio de uma típica invasina, predito por mediar a translocação da proteína do citoplasma bacteriano através da membrana (Tsai *et al.*, 2010). O alinhamento da proteína YchO também mostrou que diferentes patótipos de *E. coli*, patogênicos e não patogênicos, possuem um peptídeo sinal nesta proteína, reforçando a decisão de manter essa sequência como parte do gene. Os resultados topológicos demonstraram que a proteína codificada pelo gene *ychO* apresenta estrutura típica de invasina, com um peptídeo sinal, um domínio β -barrel e um domínio de passagem na região C-terminal (Figura 5).

(A)



(B)



Figura 5 - Estrutura da proteína YchO. (A) Predição topológica da proteína obtida pelo servidor I-Tasser. (1) peptídeo sinal; (2) o domínio β -Barrel; (3) domínio de passagem. (B) Os domínios e suas posições desenhados no MyDomains-ImageCreator. Os domínios e as coordenadas são: Peptídeo sinal (0-36), domínio β -Barrel (69-353) e o domínio de passagem (354-476). * Parte do domínio de passagem que fica dentro do β -Barrel (354-362).

6.2. Expressão dos genes *ychO*, *luxS* e *qseC* *in vitro* e *in vivo*

Inicialmente, um ensaio de expressão, utilizando qRT-PCR, dos genes *ychO*, *luxS* e *qseC* foi realizado afim de verificar sua expressão *in vitro* e *in vivo*, antes de iniciarmos as mutações. Como resultado, verificamos que os três genes são expressos em LB (*in vitro*), assim como em baço e pulmão (*in vivo*), 24 e 48 horas após a inoculação (Figura 6).

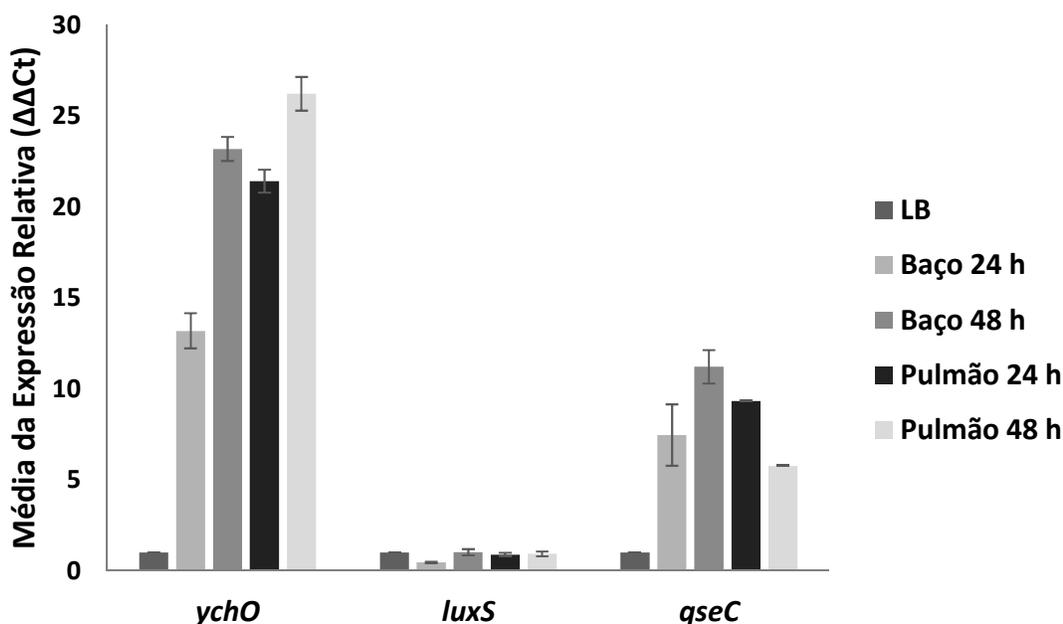


Figura 6 – Análise de expressão *in vivo*, em baço e em pulmão de pintos de um dia inoculados com 10^8 UFC/ml via saco aéreo direito, 24 e 48 horas após a inoculação, comparando-se com a expressão *in vitro* em LB.

6.3. Modificação da resistência do plasmídeo pKD46

Com a finalidade de se estudar a relação dos genes *ychO*, *luxS* e *qseC* com características de virulência, mutantes isogênicos para estes genes na linhagem APEC SEPT362 foram construídos otimizando a técnica de *Lambda Red* (Datsenko e Wanner, 2000). Esta linhagem apresenta resistência aos antibióticos Ampicilina, Tetraciclina e Estreptomicina e, como o plasmídeo pKD46 apresenta resistência original ao antibiótico Ampicilina, foi necessária, então, a modificação da resistência do plasmídeo para sua utilização na linhagem SEPT362. Para isso, o

plasmídio foi restringido utilizando-se a enzima *XmnI* em um sítio interno ao gene de resistência à Ampicilina e o cassete de resistência ao antibiótico Cloranfenicol inserido, neste mesmo sítio. A Figura 7A mostra o perfil eletroforético do plasmídio pKD46 original e do plasmídio modificado com resistência ao Cloranfenicol (pKD46Cm), e compara a linhagem SEPT362 com e sem a presença do pKD46Cm. Como a linhagem SEPT362 apresenta plasmídio de mesmo perfil que o plasmídio construído, a confirmação da linhagem SEPT362 transformada com pKD46Cm foi realizada por amplificação do cassete de cloranfenicol (Figura 7B).

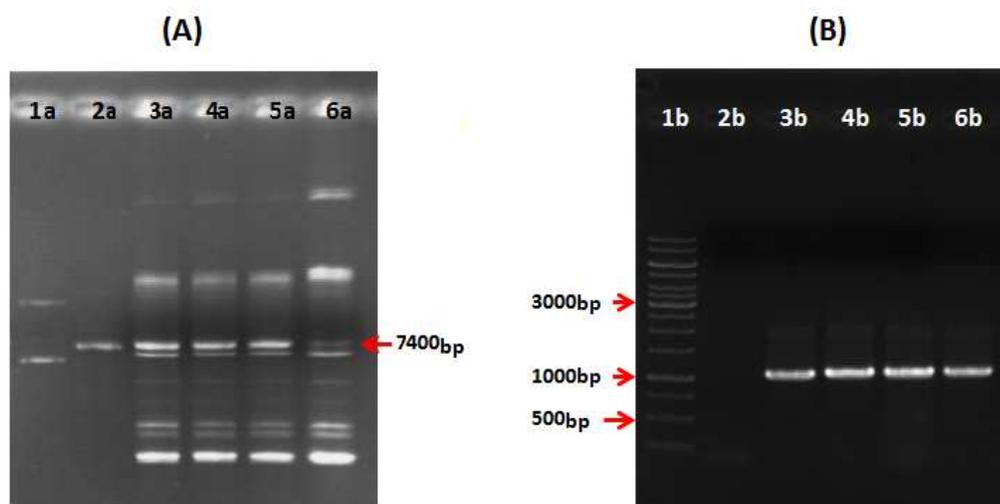


Figura 7 - Gel de agarose 0,8%. Confirmação da construção do plasmídio pKD46Cm. **(A)** Confirmação por comparação de plasmídios: **(1a)** Plasmídio pKD46; **(2a)** Plasmídio pKD46Cm (7400pb); **(3a)-(5a)** Perfil plasmidial da linhagem SEPT362 transformada com o plasmídio pKD46Cm; **(6a)** Perfil plasmidial da linhagem SEPT362. **(B)** Confirmação pela amplificação do cassete de cloranfenicol: **(1b)** Marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); **(2b)** Amplificação utilizando plasmídios da linhagem SEPT362; **(3b)-(6b)** Amplificação utilizando plasmídios da linhagem SEPT362 transformada com o plasmídio pKD46Cm (1100pb).

6.4. Construção e análise das linhagens mutante e complementada

6.4.1. Gene *ychO*

6.4.1.1. Construção do mutante $\Delta ychO$ e seu complementado

Na Figura 8, a amplificação com iniciadores externos ao gene *ychO* na linhagem mutante $\Delta ychO$ comparada com a linhagem selvagem confirma a deleção apolar do gene em questão, uma vez que a linhagem selvagem tem amplificação de 1435pb e a mutante apresenta amplificação de 1600pb, utilizando o mesmo par de iniciadores. Após a construção do mutante, o gene *ychO* da linhagem selvagem foi amplificado, juntamente com seu promotor, e clonado no vetor pACYC184, o qual foi inserido na linhagem SEPT362 $\Delta ychO$, com a finalidade de se complementar a linhagem mutante. A Figura 9 mostra o fragmento do gene amplificado e confirma sua presença na linhagem mutante complementada.

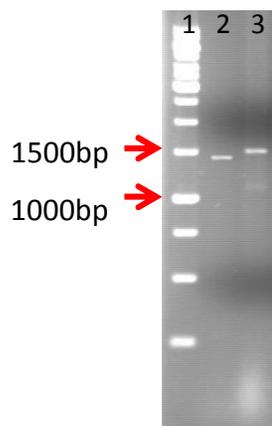


Figura 8 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção linhagem mutante utilizando iniciadores que flanqueiam externamente o gene *ychO*. **1-** Marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); **2-** Amplificação na linhagem selvagem SEPT362 (1435pb); **3-** Amplificação na linhagem mutante $\Delta ychO$ (1600pb devido recombinação do cassete de cloranfenicol).

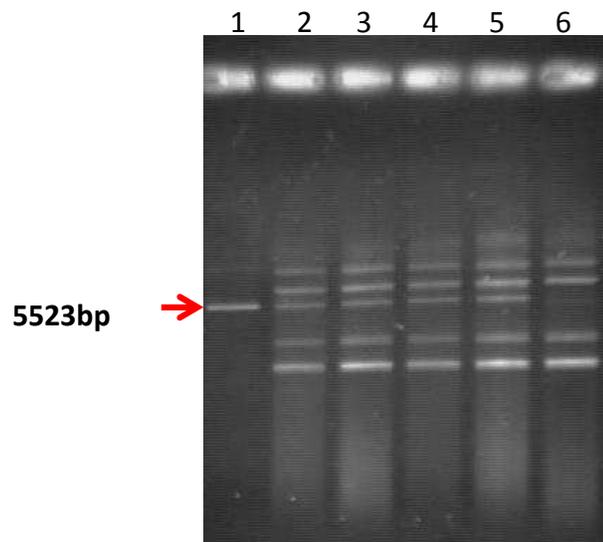


Figura 9 - Gel de agarose 0,8%. Confirmação da construção da linhagem complementada do mutante $\Delta ychO$. **1**- Plasmídio pACYC184 com o gene *ychO* (5523pb); **2 a 5** - Perfil plasmidial da linhagem SEPT362 transformada com o plasmídio construído; **6**- Perfil plasmidial da linhagem SEPT362.

6.4.1.2. Análise da expressão gênica e curva de crescimento

Após a obtenção das linhagens mutante e complementada, alguns ensaios foram realizados a fim de determinar possíveis alterações nas propriedades biológicas causadas pela deleção do gene. Em primeiro lugar, uma análise de expressão em meio DMEM foi realizada com a finalidade de confirmar a mutação e verificar a expressão da linhagem complementada em meio de cultura em que alguns ensaios *in vitro* são realizados (Figura 10). A alta expressão da linhagem complementada se deve ao número de cópias do plasmídio em que o gene *ychO* está inserido. Em seguida, uma curva de crescimento foi construída, não sendo verificada qualquer alteração na curva de crescimento das linhagens (Figura 11).

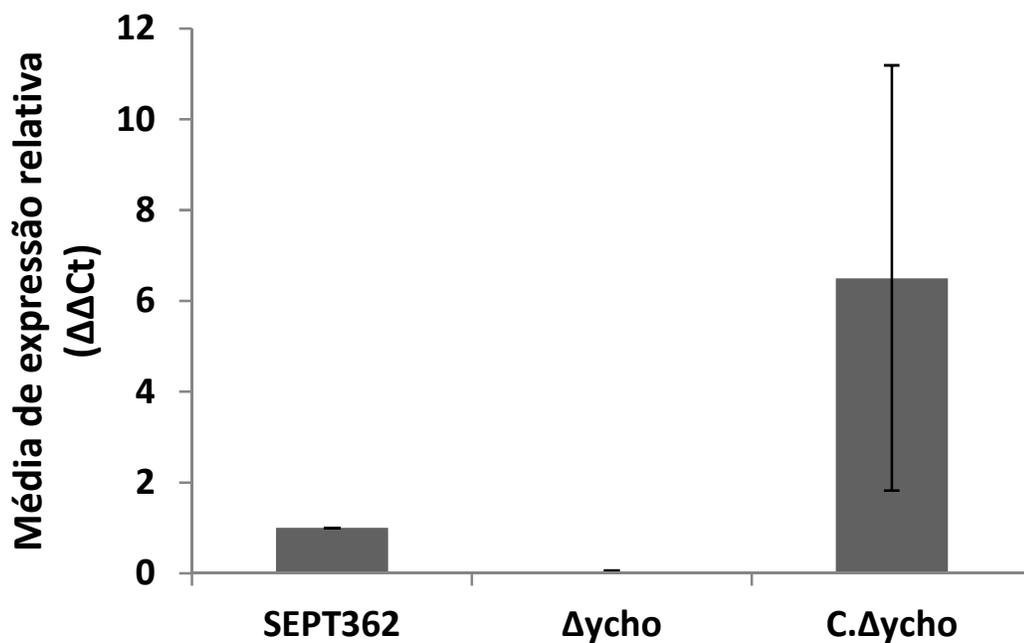


Figura 10 – Análise de expressão por qRT-PCR do gene *ychO* nas linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e C. $\Delta ychO$ crescidas em DMEM.

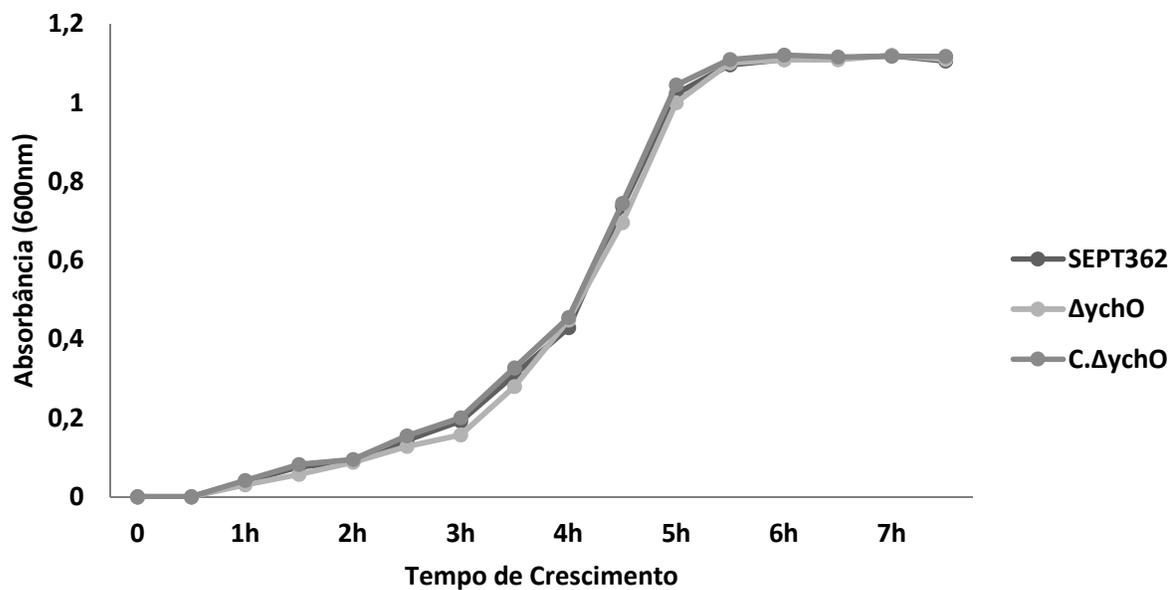


Figura 11 – Curvas de crescimento comparando as linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e C. $\Delta ychO$.

6.4.1.3. Avaliação da taxa de mortalidade em aves infectadas

Ensaios *in vivo* foram utilizados para avaliar a patogenicidade da linhagem SEPT362, mutante e complementado. Para isso, grupos de pintos (Cobb) de 1 dia de vida (n=20) foram infectados com as linhagens selvagem, mutante e complementada (Figura 12). Nas análises do mutante *ychO*, a taxa de mortalidade de aves infectadas com a linhagem selvagem foi de 30% no primeiro dia, 70% no terceiro dia e 90% no final do experimento, enquanto que para o mutante, a taxa foi de 35% no primeiro dia, 45% no terceiro e 60% no sétimo dia. Embora esses resultados não apresentem diferença significativa em nenhum ponto (χ^2 , $p>0,05$), uma mudança no perfil da mortalidade pode ser observada na linhagem mutante quando comparada à linhagem selvagem (Figura 12). A linhagem complementada apresentou perfil de mortalidade similar ao da linhagem selvagem. Nenhuma mortalidade foi observada para o controle negativo infectado com 10^9 UFC/ml de *E. coli* DH10 β .

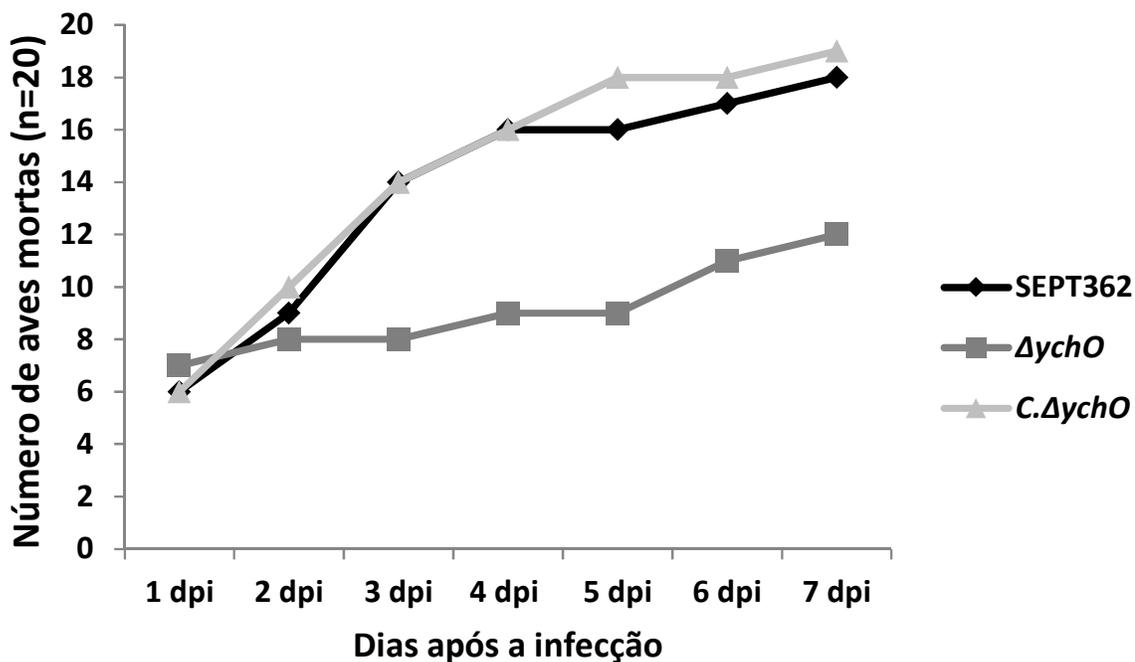


Figura 12 - Perfil de mortalidade das aves infectadas com 10^9 UFC/ml (n=20) das linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e *C.ΔychO*. Diferença não estatística determinada pelo teste de Qui-Quadrado comparando com a linhagem selvagem, em todos os pontos ($p>0,05$).

6.4.1.4. Motilidade e formação de biofilme

Como mostrado na Figura 13, a deleção do gene *ychO* reduziu de maneira significativa a capacidade de motilidade do tipo *swimming*, quando comparado à linhagem selvagem (Tukey, $p < 0,05$) após 16 horas de incubação, enquanto que para a linhagem complementada a motilidade foi parcialmente restaurada. Para verificar se a alteração na motilidade era devido a uma alteração na expressão de genes relacionados à motilidade ou uma possível alteração na membrana celular, a expressão dos genes *fliC*, *flhD*, *motA* e *flgE* foi verificada (Figura 14), comparando-se as três linhagens. Como resultado não houve diferença significativa na expressão entre as linhagens (Tukey, $p > 0,05$).

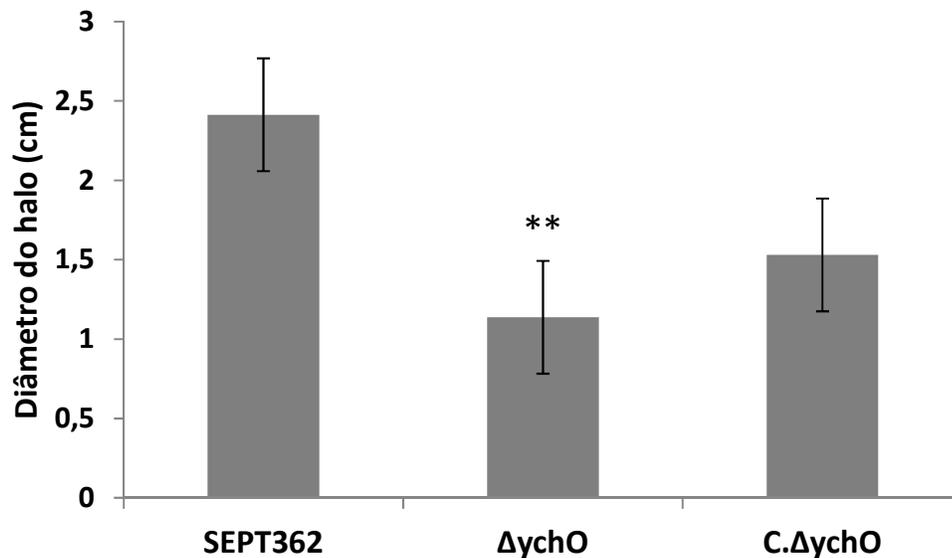


Figura 13 - Motilidade do tipo *Swimming* nas linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e C. $\Delta ychO$. Medidas dos halos do ensaio de motilidade após 16 h. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey em comparação com a motilidade da linhagem selvagem (**, $p < 0,01$).

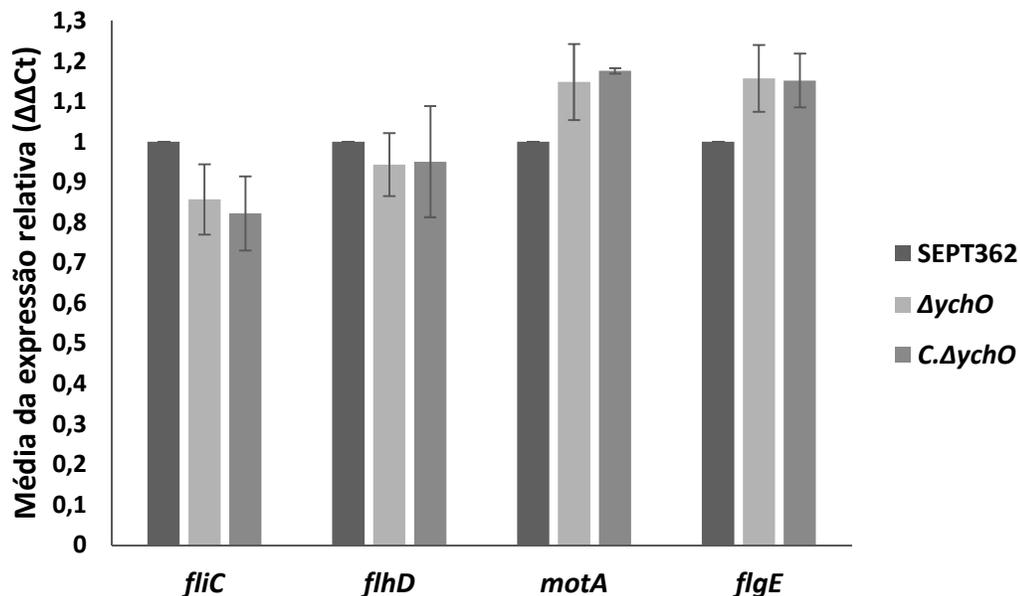


Figura 14 - Análise de expressão dos genes *fliC*, *flhD*, *motA* e *flgE* nas linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e $C.\Delta ychO$ crescidas em DMEM. Diferença não estatística determinada pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Devido à capacidade da linhagem SEPT362 em formar biofilmes em superfícies abióticas, esta foi avaliada utilizando-se o teste de cristal violeta em poliestireno (Figura 15). Embora não exista diferença estatística nas curvas de crescimento das linhagens mutante e complementada quando comparada à selvagem, o mutante $\Delta ychO$ formou 50% menos biofilme que a selvagem após 24 h e 24% menos após 48 h de crescimento na superfície abiótica, indicando que o gene *ychO* influencia na formação do biofilme. A linhagem complementada formou 35% mais biofilme que a selvagem, o que ocorreu devido ao efeito da dosagem gênica do *ychO* devido à natureza plasmidial de sua localização, e mostra, mais uma vez, a influência do gene na formação do biofilme.

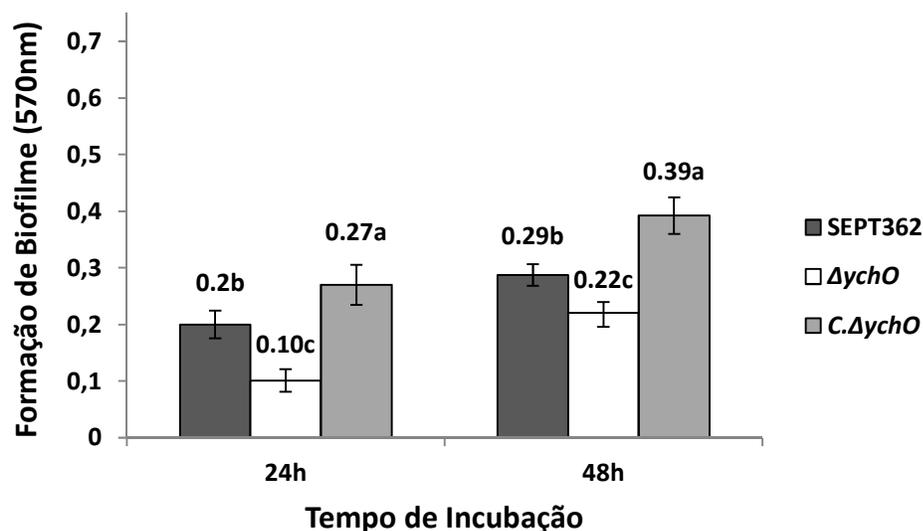


Figura 15 - Formação de biofilme 24 e 48 horas após a inoculação em DMEM em placas de poliestireno ($\Delta ychO$). Médias seguidas por letras diferentes são diferentes significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

6.4.1.5. Adesão em fibroblastos de embrião de galinha (FEG)

A capacidade das linhagens em aderir às células FEG foi avaliada para entender as possíveis influências do gene nesse fenótipo frente a uma linhagem de origem aviária. Essa capacidade também foi testada na presença do análogo da manose methyl-alpha-D-mannopyranoside (Sigma, USA), um antagonista da Fímbria do tipo 1 (Abgottspon *et al.*, 2010). O número de bactérias que aderiram às FEG pré-fixadas foi significativamente menor para a linhagem mutante que para a selvagem na presença e na ausência do análogo da manose (Figura 16), o que sugere o envolvimento desta proteína na adesão da linhagem SEPT362. A linhagem complementada teve a adesão praticamente restaurada. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101. Com a finalidade de confirmar se essa alteração foi devida à falta da provável invasina YchO, ou à alteração na expressão de outras adesinas presentes na linhagem SEPT362, uma análise de expressão gênica foi realizada com os genes *ecp* (*E. coli common pilus*), *csgA* (Fímbria *curli*), *lpfA* (*long polar fimbria subunit A*), *aatA* (autotransportadora) e *aatB* (autotransportadora) (Krogfelt, Bergmans e Klemm, 1990; Rendón *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Zhuge *et al.*, 2013). Nenhuma diferença foi encontrada entre as linhagens (Figura 17),

sugerindo mais uma vez que a provável invasina foi a responsável pela diminuição na adesão, ressaltando seu papel neste fenótipo.

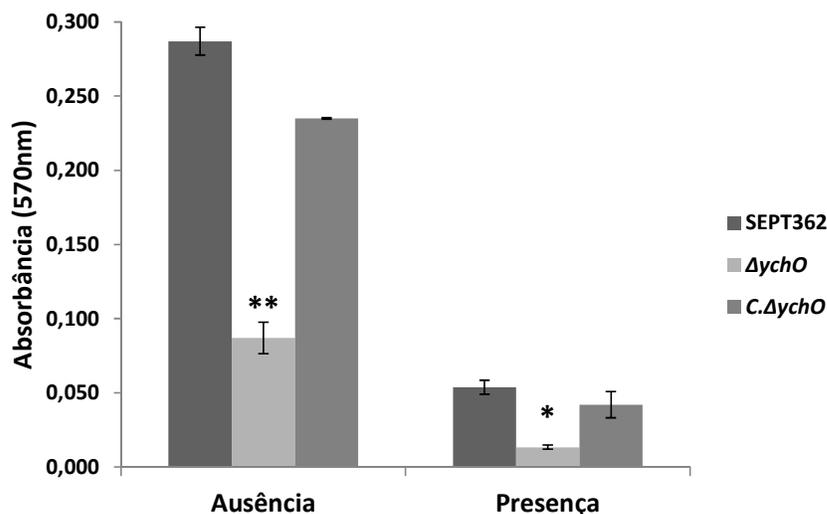


Figura 16 - Quantificação da adesão das linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e C. $\Delta ychO$ na linhagem celular Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG), na ausência e na presença do análogo da manose methyl-alpha-D-mannopyranoside. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey em comparação à linhagem selvagem (**, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

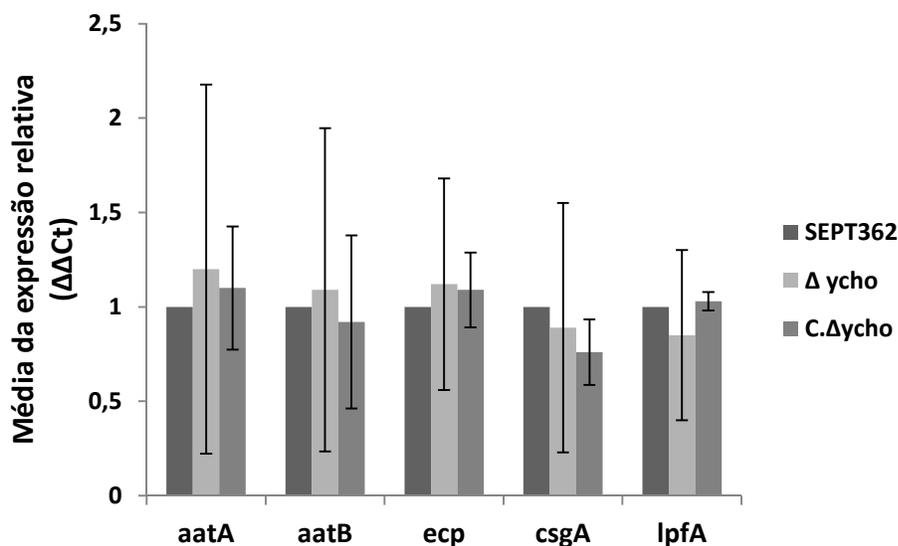


Figura 17 – Análise da expressão gênica de genes relacionados à adesão nas linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e C. $\Delta ychO$. Diferença não estatística determinada pelo teste de Tukey em comparação à linhagem selvagem ($p > 0,05$).

6.4.1.6. Invasão em células CEC-32

A habilidade das linhagens em invadir a linhagem celular CEC-32 (fibroblasto de embrião de galinha) e a potencial contribuição da invasina YchO para este fenótipo foram testadas. A linhagem SEPT362 foi capaz de invadir células CEC-32 eficientemente, e o gene *ychO* apresenta papel importante nesse fenótipo. O ensaio de invasão foi dividido em dois diferentes tratamentos: após a incubação com a bactéria, um conjunto de células foi incubado com 50 µg/ml de gentamicina para remover as bactérias aderidas e do meio de cultura, e o outro, após a remoção das bactérias externas teve 1,5 h de incubação com 5 µg/ml de gentamicina para verificar a sobrevivência dentro deste tipo celular. O número de bactérias viáveis, após a invasão, foi menor na linhagem mutante que na selvagem, em ambos os tratamentos (Figura 18). Os resultados também mostraram que a linhagem selvagem manteve número praticamente constante em ambos os tratamentos, enquanto que a linhagem mutante reduziu este número após um tempo extra de 1,5 h. A linhagem complementada teve sua capacidade de invasão e sobrevivência praticamente restauradas. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101. Esses dados sugerem que *ychO* tem papel na invasão e na sobrevivência em FEG.

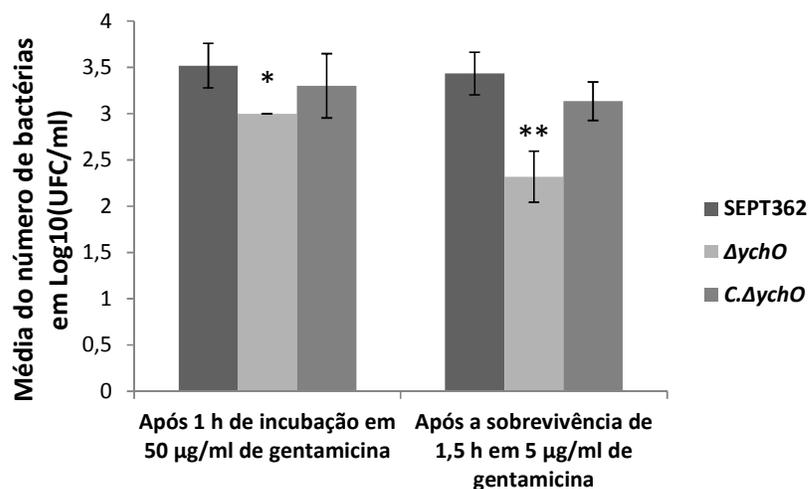


Figura 18 - Ensaio de invasão das linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e *C.ΔychO* em célula CEC-32 após 1 h de incubação com 50 µg/ml de gentamicina e após sobrevivência de 1,5 h em 5 µg/ml de gentamicina. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey em comparação à linhagem selvagem (**, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

6.4.1.7. Sobrevivência em macrófagos HD11

Muitas bactérias que causam septicemia são capazes de sobreviver à fagocitose por macrófagos (Grassl e Finlay, 2008). A sobrevivência da linhagem SEPT362 e de suas derivadas em macrófagos foi analisada utilizando-se a linhagem HD11 de macrófagos de galinha. Os resultados mostraram que o mutante $\Delta ychO$ apresenta menor capacidade de sobrevivência intra-macróforo que a linhagem selvagem após 3 horas de incubação, enquanto que a linhagem complementada restaura este fenótipo (Figura 19). Após 20 horas, não há diferença na capacidade de sobrevivência das três linhagens. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101. Esses dados sugerem que a invasina *ychO* está envolvida nos estágios iniciais da sobrevivência intra-macróforos.

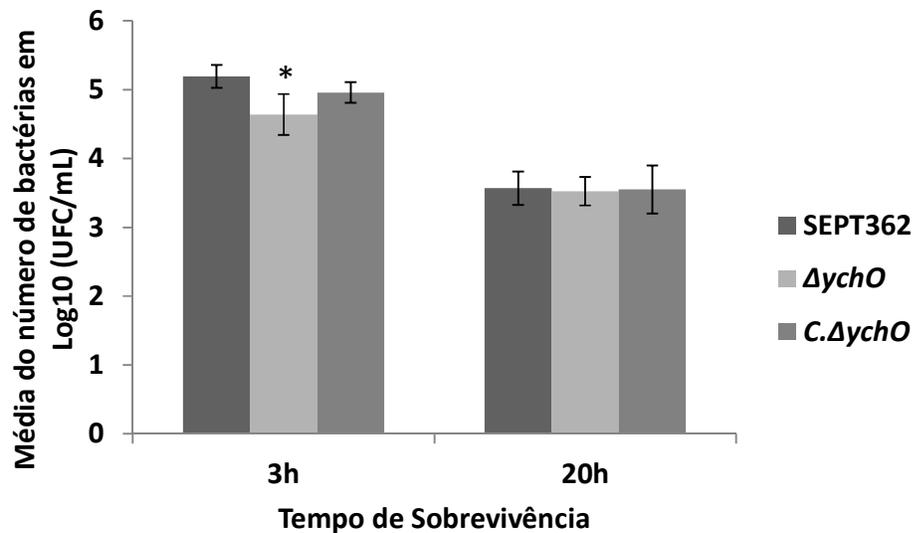


Figura 19 - Sobrevivência das linhagens SEPT362, $\Delta ychO$ e C. $\Delta ychO$ em macrófagos HD11 após 3 h e 20 h. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey em comparação à linhagem selvagem (*, $p < 0,05$).

6.4.2. Gene *luxS*

6.4.2.1. Construção do mutante $\Delta luxS$ e seu complementado

A Figura 20 confirma a construção do mutante $\Delta luxS$. Iniciadores que flanqueiam o gene *luxS* internamente e externamente foram utilizados, de forma a obter um inserto de 516pb para a linhagens selvagem e nenhum inserto para a mutante, utilizando os iniciadores internos, e obter insertos de 593pb para a linhagem selvagem e 1600pb para a linhagem mutante, utilizando-se os iniciadores externos, confirmando, assim, a deleção apolar do gene em questão. Após a construção do mutante, o gene *luxS* da linhagem selvagem foi amplificado juntamente com seu promotor e clonado no vetor pACYC184, o qual foi inserido na linhagem SEPT362 $\Delta luxS$, com a finalidade de se complementar a linhagem mutante. A Figura 21 mostra o fragmento do gene amplificado e confirma sua presença na linhagem mutante complementada.

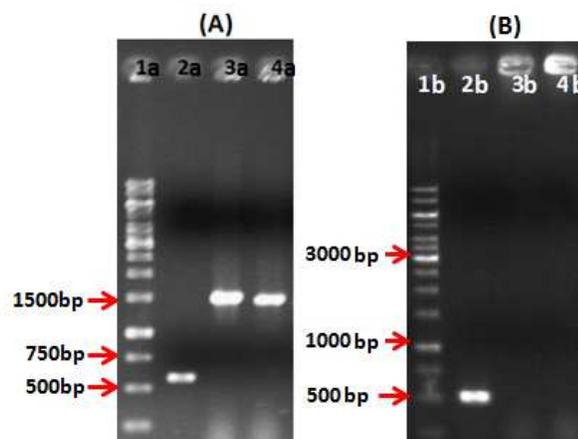


Figura 20 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção linhagem mutante utilizando iniciadores que flanqueiam externamente (A) e internamente (B) o gene *luxS*. A: (1a) Marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); (2a) Amplificação na linhagem selvagem (593pb); (3a)-(4a) Amplificação na linhagem mutante (1,6kb).; B: (1b) Marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); (2b) Amplificação na linhagem selvagem (516pb); (3b)-(4b) Amplificação na linhagem mutante.

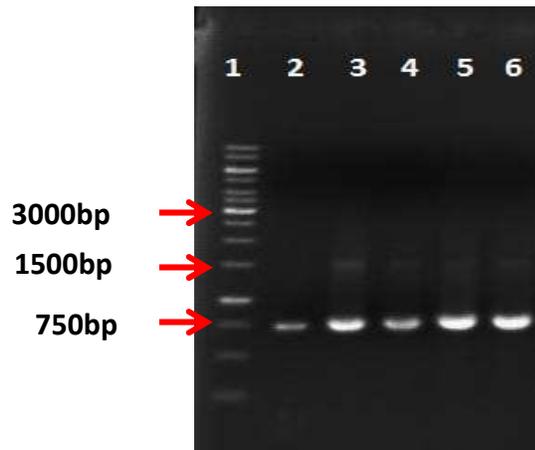


Figura 21 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção da linhagem complementada do mutante *luxS* SEPT362. (1) Marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); (2) Amplificação do gene *luxS* da cepa selvagem com seu respectivo promotor (716pb); (3)-(6) Amplificação do gene *luxS* da linhagem mutante complementada (716pb).

6.4.2.2. Análise da expressão gênica e curva de crescimento

Após a obtenção das linhagens mutante e complementada, alguns ensaios foram realizados a fim de se determinar possíveis alterações nas propriedades biológicas causadas pela deleção dos gene. Em primeiro lugar, uma análise *in vitro* da expressão em meio DMEM foi realizada com a finalidade de verificar a ausência da expressão pela linhagem mutante e verificar a expressão da linhagem complementada (Figura 22). A alta expressão da linhagem complementada se deve, provavelmente, à natureza plasmidial do gene estudado, o qual possui mais que uma cópia por cromossomo bacteriano. Em seguida, uma curva de crescimento foi construída, não se verificando diferenças entre as linhagens nas curvas de crescimento (Figura 23).

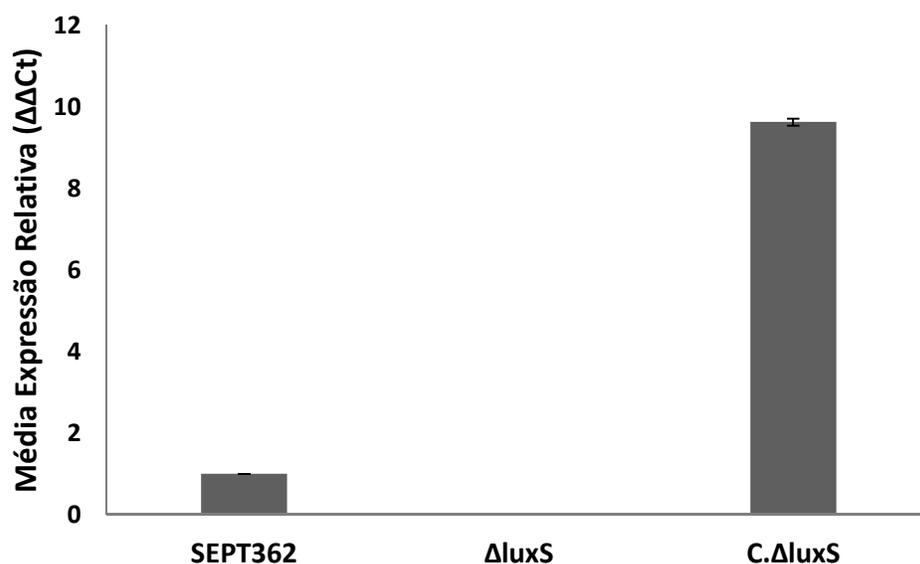


Figura 22 - Análise de expressão de *luxS* qRT-PCR, nas linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e C. $\Delta luxS$ crescidas em DMEM.

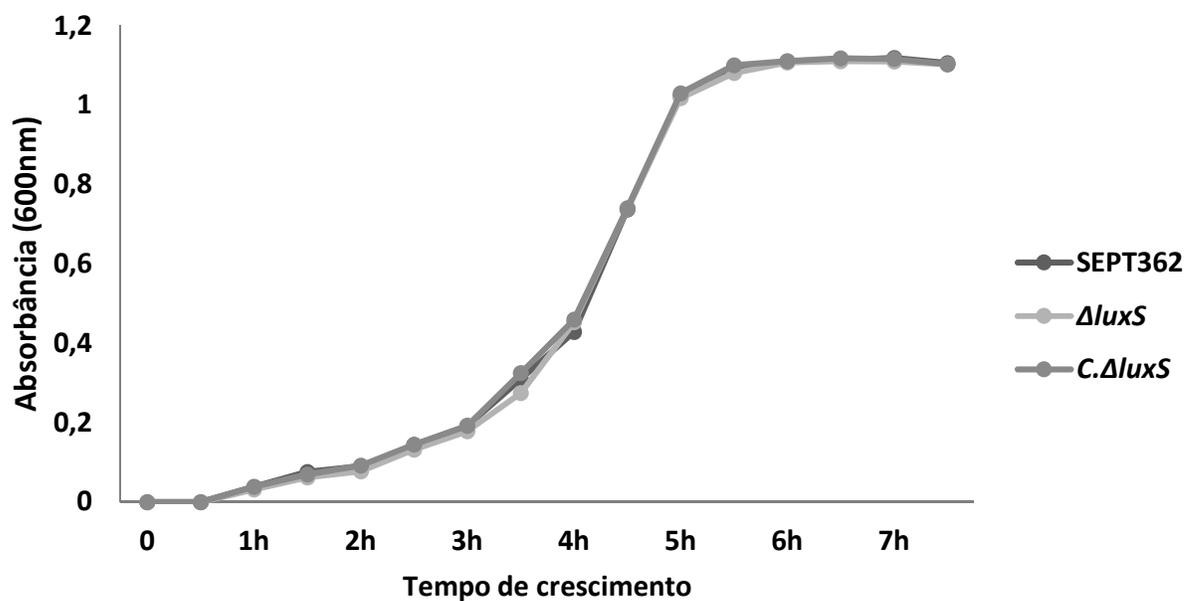


Figura 23 – Curvas de crescimento comparando as linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e C. $\Delta luxS$.

6.4.2.3. Avaliação da taxa de mortalidade em aves infectadas

Nas análises do mutante *luxS*, a taxa de mortalidade de aves infectadas com a linhagem selvagem foi de 45% no primeiro dia, 55% no terceiro dia e 65% no final do experimento, enquanto que para o mutante, a taxa foi de 40% no primeiro dia, 50% no terceiro e 60% no sétimo dia. Esses resultados não apresentam nenhuma diferença significativa, em nenhum ponto (χ^2 , $p > 0,05$) (Figura 24). A linhagem complementada apresentou perfil de mortalidade similar ao da linhagem selvagem. Nenhuma mortalidade foi observada para o controle negativo inoculado com 10^9 UFC/ml de *E. coli DH10 β* .

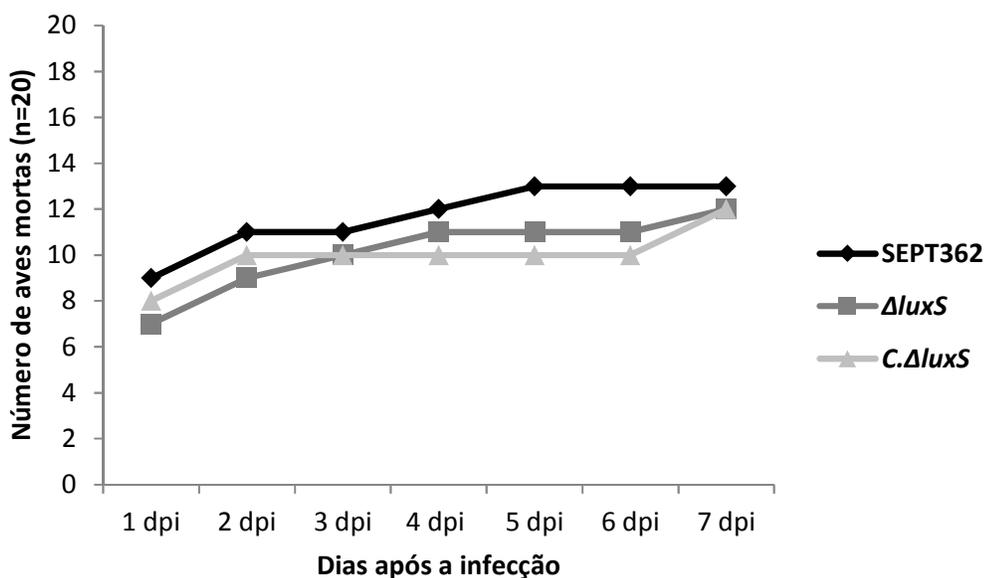


Figura 24 - Perfil de mortalidade das aves infectadas com 10^9 UFC/ml ($n=20$) das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e *C.ΔluxS*. Diferença não estatística determinada pelo teste de Qui-Quadrado comparando com a linhagem selvagem ($p > 0,05$).

6.4.2.4. Motilidade e formação de biofilme

Como mostrado na Figura 25, a deleção do gene *luxS* manteve a capacidade de motilidade do tipo *swimming*, quando comparado à linhagem selvagem (Tukey, $p > 0,05$), após 16 horas de incubação. No ensaio de biofilme, o mutante $\Delta luxS$ formou aproximadamente a mesma quantidade de biofilme que a selvagem após 24 e 48 h de crescimento na superfície abiótica

(Figura 26). Embora não exista diferença nas curvas de crescimento das linhagens mutante e complementada quando comparadas à selvagem, a linhagem complementada formou 45% mais biofilme que a selvagem, devido provavelmente à natureza plasmidial do gene *luxS* na linhagem complementada.

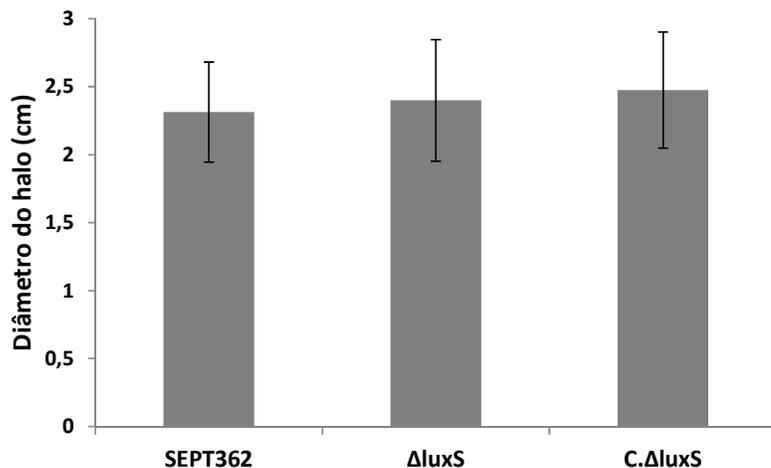


Figura 25 - Motilidade do tipo *Swimming* ($\Delta luxS$). Medidas dos halos do ensaio de motilidade após 16 h. Diferença não estatística determinada pelo teste de Tukey em comparação com a motilidade da linhagem selvagem ($p > 0,05$).

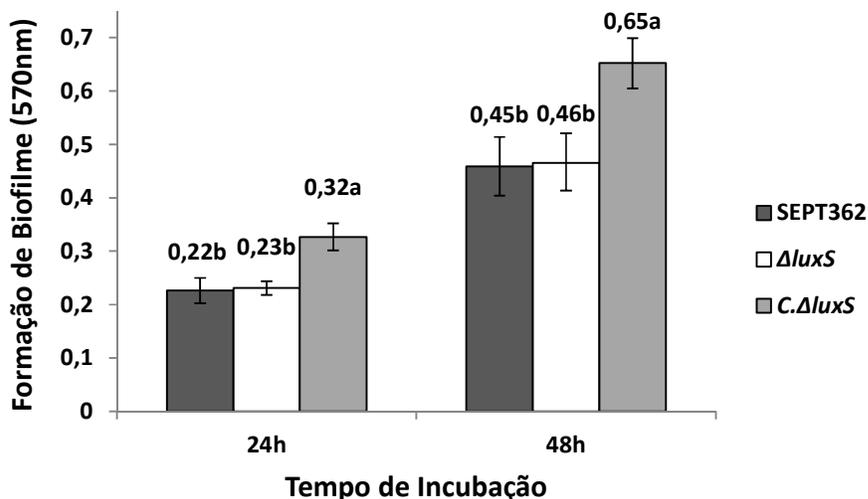


Figura 26 - Formação de biofilme 24 e 48 horas após a inoculação em DMEM em placas de poliestireno das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e C. $\Delta luxS$. Médias seguidas por letras diferentes são diferentes significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

6.4.2.5. Adesão em fibroblasto de embrião de galinha (FEG)

A capacidade das linhagens deste estudo de aderir às células FEG foi avaliada para se entender as possíveis influências do gene *luxS* nesse fenótipo. O número de bactérias que aderiram às células FEG pré-fixadas foi significativamente menor para o mutante que para o selvagem na ausência do análogo da manose, e a adesão foi restaurada pelo complementado (Figura 27A). No entanto, não houve diferença significativa, na adesão, na presença do análogo da manose, entre as três linhagens. E, como existe diferença significativa na adesão tanto da linhagem selvagem e complementada quanto da mutante quando se é adicionado o análogo da manose (Figura 27B), sugere-se que o gene influencia a adesão da SEPT362 alterando a expressão na fímbria no tipo 1. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101. Com isso, a expressão do gene *fimH*, subunidade adesiva da Fímbria do tipo 1, foi verificada. Como resultado, a falta do gene *luxS* reduziu significativamente (Tukey, $p < 0,01$) a expressão de *fimH*, enquanto que o complementado restaurou em parte sua expressão, sugerindo que o gene *luxS* participa da regulação da fímbria do tipo 1 (Figura 28).

6.4.2.6. Invasão em células CEC-32

A habilidade das linhagens em invadir a linhagem celular CEC-32 (fibroblasto de embrião de galinha) e a potencial contribuição do gene *luxS* para este fenótipo foram testadas. A linhagem SEPT362 foi capaz de invadir células CEC-32 eficientemente, e o gene *luxS* não apresenta papel aparente nesse fenótipo. O ensaio de invasão foi dividido em dois diferentes tratamentos: um conjunto de células lisado imediatamente após a incubação com 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, e o outro foi lisado após 1,5 h de incubação extra com 5 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. O número de bactérias viáveis após a invasão e a sobrevivência foi igual nas linhagens mutante, complementada e selvagem (Figura 29). Nenhuma contagem foi obtida para a linhagem controle *E. coli* HB101.

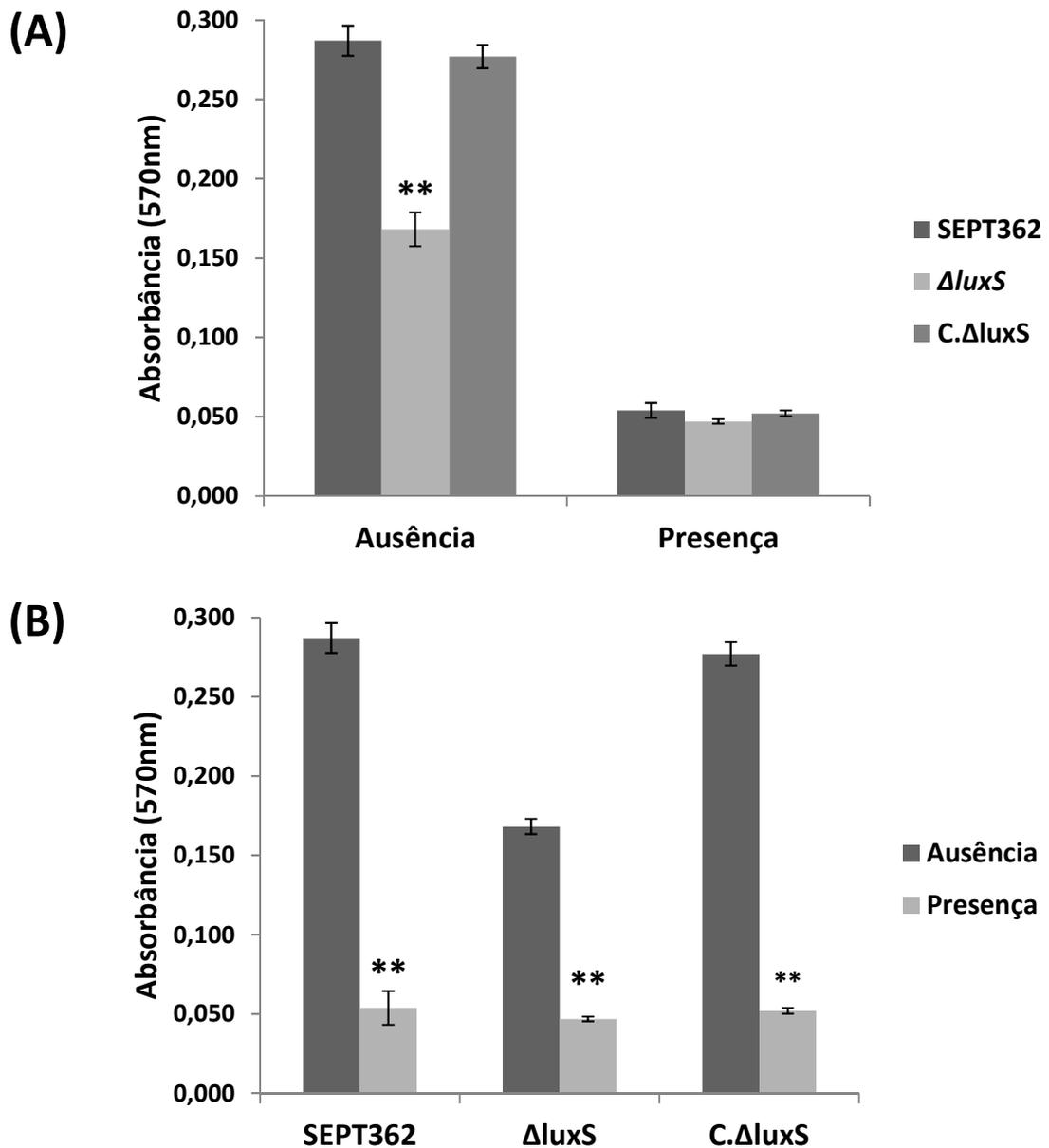


Figura 27 – Adesão à linhagem celular Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG) na ausência e na presença do análogo da manose methyl-alpha-D-mannopyranoside. (A) Quantificação da adesão x presença/ausência (B) Quantificação da adesão x linhagens. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey em comparação com a linhagem selvagem (**, $p < 0,01$).

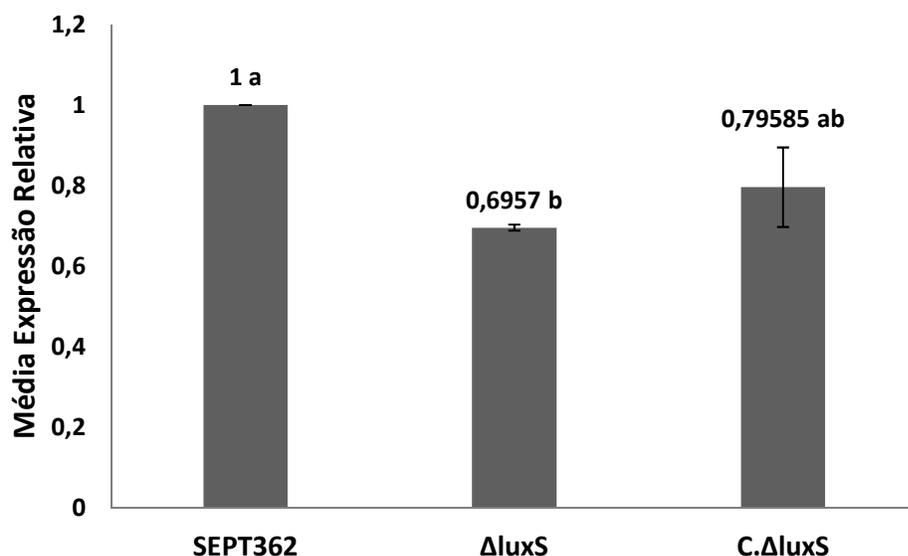


Figura 28 – Análise de expressão do gene *fimH* nas linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e C. $\Delta luxS$. Médias seguidas por letras diferentes são diferentes significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

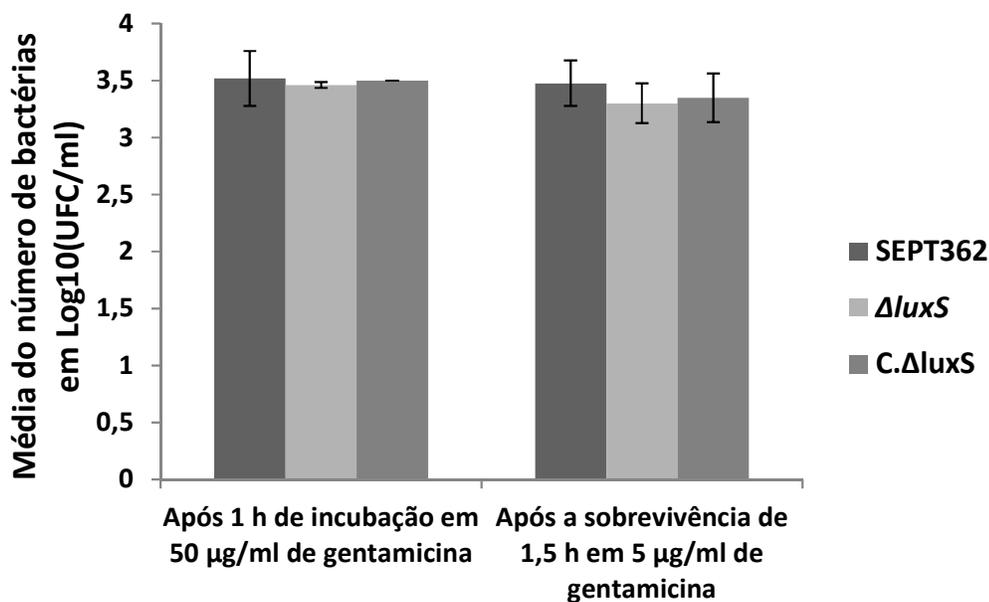


Figura 29 - Ensaio de invasão das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e C. $\Delta luxS$ em células CEC-32 após 1 h de incubação com 50 µg/ml de gentamicina e após sobrevivência de 1,5 h em 5 µg/ml de gentamicina. Diferença estatística determinada pelo teste de Tukey comparando com a linhagem selvagem ($p > 0,05$).

6.4.2.7. Sobrevivência em macrófagos HD11

Os resultados mostraram que a linhagem mutante $\Delta luxS$ e a linhagem complementada apresentam a mesma capacidade de sobrevivência intra-macróforo que a linhagem selvagem, após 3 e 20 h de incubação (Figura 30). Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101. Esses dados sugerem que o gene *luxS* não está envolvido na viabilidade intra-macróforos.

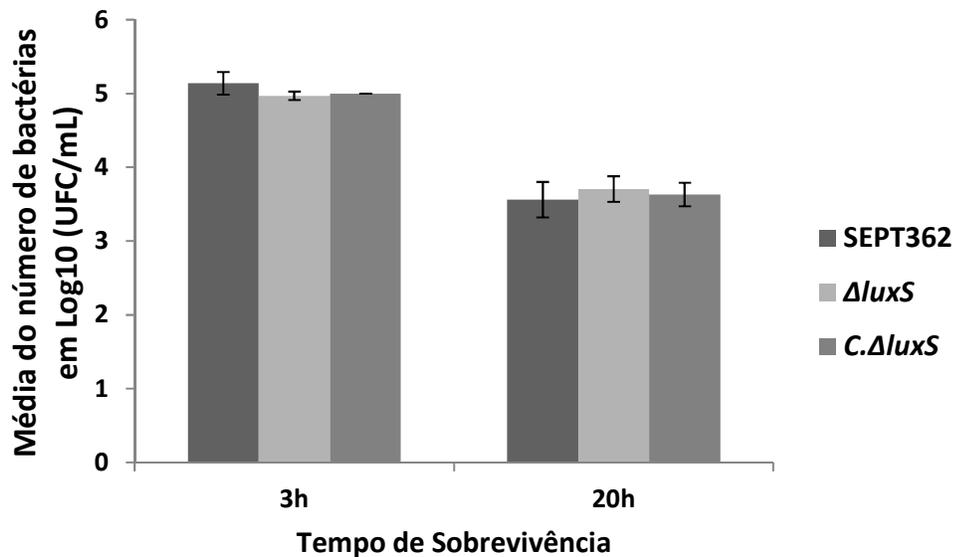


Figura 30 - Sobrevivência das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e *C.ΔluxS* em macrófagos HD11, após 3 h e 20 h. Diferença não estatística determinada pelo teste de Tukey comparando com a linhagem selvagem ($p > 0,05$).

6.4.3. Gene *qseC*

6.4.3.1. Construção do mutante $\Delta qseC$ e seu complementado

A Figura 31 confirma a construção do mutante $\Delta qseC$, utilizando-se iniciadores que flanqueiam o gene *qseC* internamente e externamente. A amplificação utilizando-se iniciadores externos geram fragmentos de 1350pb na linhagem selvagem e de 1600pb na linhagem mutante,

enquanto que a que utiliza iniciadores internos amplificam 1310pb na linhagem selvagem e não amplificam na mutante, confirmando assim a deleção apolar do gene em questão.

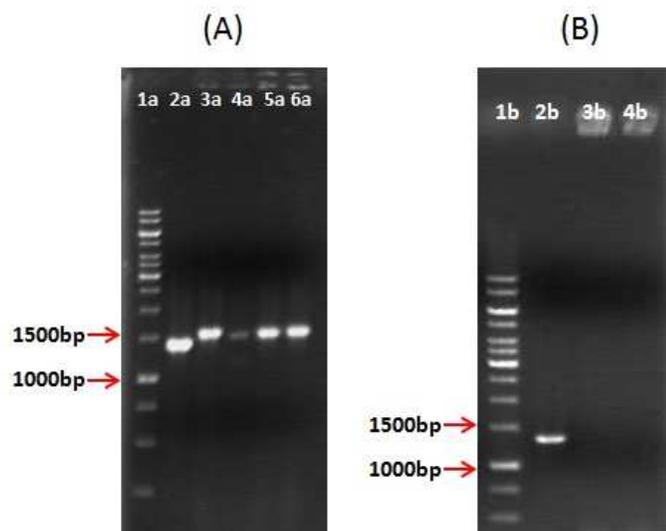


Figura 31 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção linhagem mutante utilizando iniciadores que flanqueiam externamente (A) e internamente (B) o gene *qseC*. A: (1a) Marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); (2a) Amplificação na linhagem selvagem (1,35kb); (3a)-(6a) Amplificação na linhagem mutante (1,6kb).; B: (1b) Marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); (2b) Amplificação na linhagem selvagem (1310pb); (3b)-(4b) Amplificação na linhagem mutante.

Para a complementação do mutante $\Delta qseC$, o gene *qseC* foi amplificado e clonado no vetor pACYC184 de forma a utilizar o promotor do gene de resistência à tetraciclina para sua expressão. A Figura 32 mostra o fragmento do gene amplificado e confirma sua presença na linhagem mutante complementada.

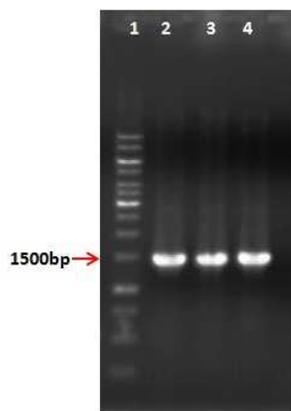


Figura 32 - Gel de agarose 1%. Confirmação da construção do complementado do mutante *qseC* SEPT362. (1) Marcador molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); (2) Amplificação do gene *qseC* da cepa selvagem (1,42kb); (3)-(4) Amplificação do gene *luxS* da linhagem mutante complementada (1,42pb).

6.4.3.2. Análise de expressão gênica e curva de crescimento

Após a obtenção das linhagens mutante e complementada, uma análise de expressão *in vitro* em meio DMEM foi realizada sendo confirmada a mutação e a expressão pela linhagem complementada (Figura 33). Em seguida, uma curva de crescimento foi construída, verificando-se que não há diferenças nas curvas das linhagens estudadas (Figura 34).

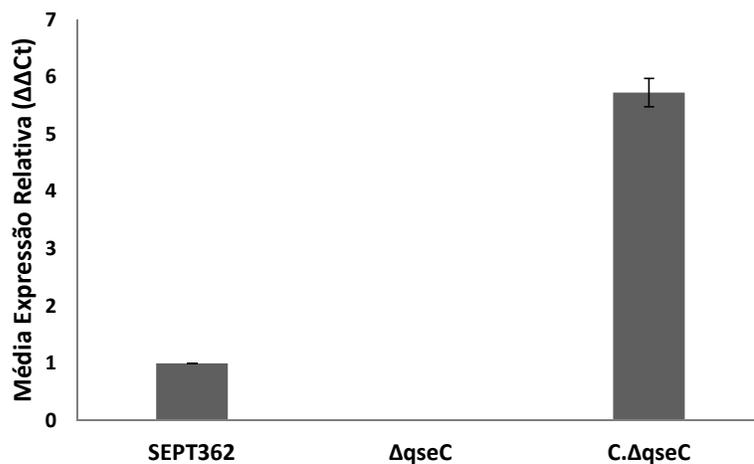


Figura 33 - Análise de expressão, utilizando qRT-PCR, de *qseC* nas linhagens SEPT362, *ΔqseC* e C.*ΔqseC* crescidas em DMEM.

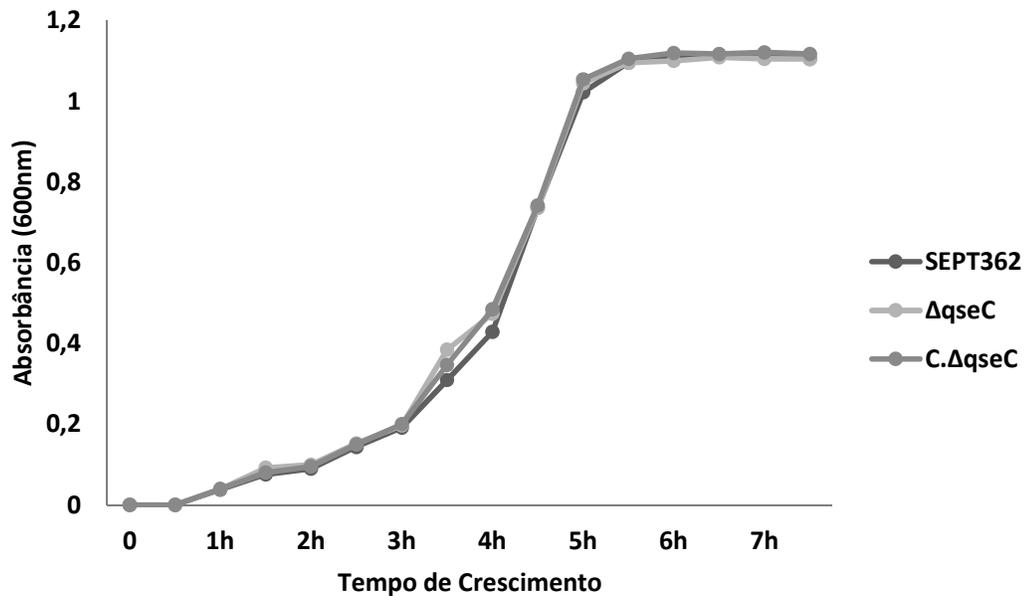


Figura 34 - Curvas de crescimento comparando-se as linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e C. $\Delta qseC$.

6.4.3.3. Avaliação da taxa de mortalidade em aves infectadas

Nas análises do mutante *qseC*, a taxa de mortalidade de aves infectadas com a linhagem selvagem foi de 45% no primeiro dia, 55% no terceiro dia e 65% no final do experimento, enquanto que para o mutante, a taxa foi de 25% no primeiro dia, 35% no terceiro e 45% no sétimo dia. Embora esses resultados não apresentem nenhuma diferença significativa (χ^2 , $p > 0,05$), uma mudança no perfil da mortalidade pode ser observada na linhagem mutante quando comparada à linhagem selvagem (Figura 35). A linhagem complementada apresentou perfil de mortalidade similar ao da linhagem selvagem. Nenhuma mortalidade foi observada para o controle negativo infectado com 10^9 UFC/ml de *E. coli DH10 β* .

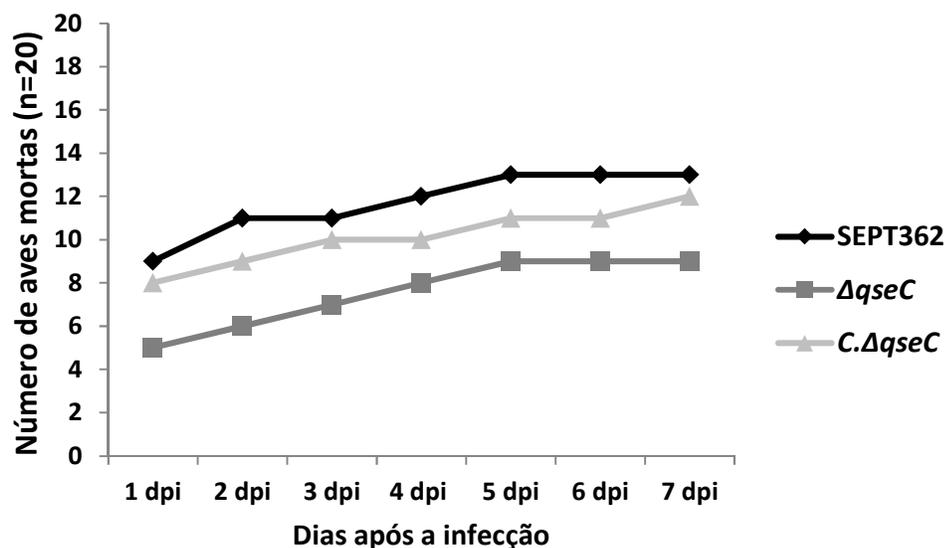


Figura 35 - Perfil de mortalidade das aves infectadas com 10^9 UFC/ml ($n=20$) das linhagens SEPT362, $\Delta luxS$ e *C.ΔluxS*. Diferença não estatística determinada pelo teste de Qui-Quadrado comparando-se com a linhagem selvagem ($p>0,05$).

6.4.3.4. Motilidade e formação de biofilme

Como mostrado na Figura 36, a deleção do gene *qseC* manteve a capacidade de motilidade do tipo *swimming* na linhagem mutante, quando comparada à linhagem selvagem (Tukey, $p>0,05$), após 16 horas de incubação.

No ensaio de biofilme, o mutante $\Delta qseC$ formou aproximadamente a mesma quantidade de biofilme que a selvagem e a complementada após 24 e 48 h de crescimento na superfície abiótica (Figura 37). Não houve diferença nas curvas de crescimento das linhagens mutante e complementada quando comparada à selvagem.

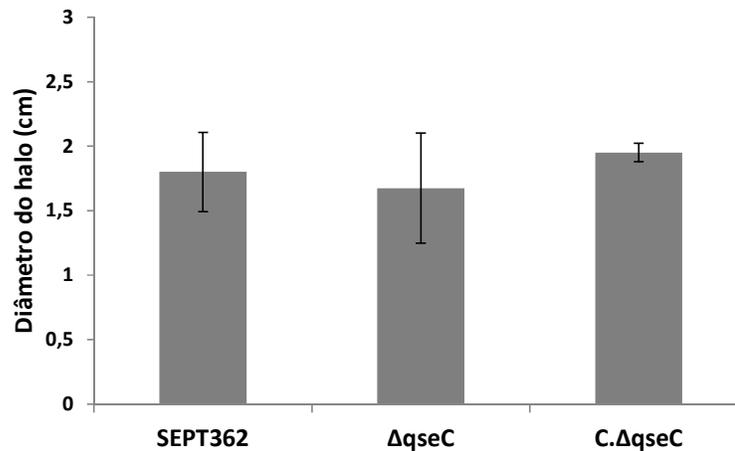


Figura 36 - Motilidade do tipo *Swimming* das linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e C. $\Delta qseC$. Medidas dos halos do ensaio de motilidade após 16 h. Diferença não estatística determinada pelo teste de Tukey em comparação com a motilidade da linhagem selvagem ($p > 0,05$).

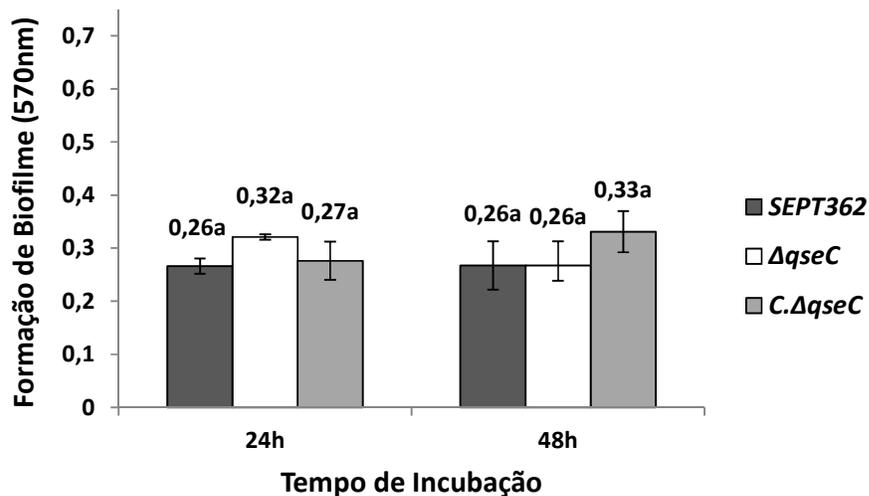


Figura 37 - Formação de biofilme 24 e 48 horas após a inoculação em meio DMEM em placas de poliestireno pelas linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e C. $\Delta qseC$. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente (Tukey, $p > 0,05$).

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

A capacidade das linhagens em aderir às células FEG foi avaliada para entender as possíveis influências do sistema AI-3 nesse fenótipo. O número de bactérias que aderiram às FEG

pré-fixadas foi significativamente menor para o mutante que para o selvagem na ausência do análogo da manose (Figura 38A). O complementado restaurou a adesão. No entanto, não houve diferença significativa na presença do análogo da manose entre as três linhagens. E, como não existe diferença significativa na adesão tanto das linhagens selvagem e complementada quanto da mutante quando se é adicionado o análogo da manose (Figura 38B), sugere-se que o gene *qseC* influencia na adesão da SEPT362, de forma que a falta do gene inibe a expressão na fímbria do tipo 1. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101.

Com isso, a expressão do gene *fimH*, subunidade adesiva da Fímbria do tipo 1, foi verificada. Como resultado, a falta do gene *qseC* reduziu significativamente (Tukey, $p < 0,01$) a expressão de *fimH*, enquanto que o complementado restaurou em parte sua expressão, sugerindo que o gene *qseC* participa da regulação da fímbria do tipo 1 (Figura 39).

6.4.3.6. Invasão em células CEC-32

A habilidade das linhagens em invadir as linhagens celulares CEC-32 (fibroblasto de embrião de galinha) e a potencial regulação deste fenótipo pelo sistema AI-3 foram testadas. A linhagem SEPT362 foi capaz de invadir células CEC-32 eficientemente, e o gene *qseC* apresenta papel importante nesse fenótipo. O ensaio de invasão foi dividido em dois diferentes tratamentos: um conjunto de células lisado imediatamente após a incubação com 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, sendo o outro lisado após 1,5 h de incubação com 5 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. O número de bactérias viáveis após a invasão foi menor na linhagem mutante que na selvagem, apenas após o tempo extra de 1,5 h (Figura 40). A linhagem complementada apresentou restauração da sobrevivência após 1,5 h. Os resultados também mostraram que as linhagens selvagem e complementada apresentaram número de células praticamente constantes em ambos os tratamentos, enquanto que a linhagem mutante teve seu número reduzido após um tempo extra de 1,5 h. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101.

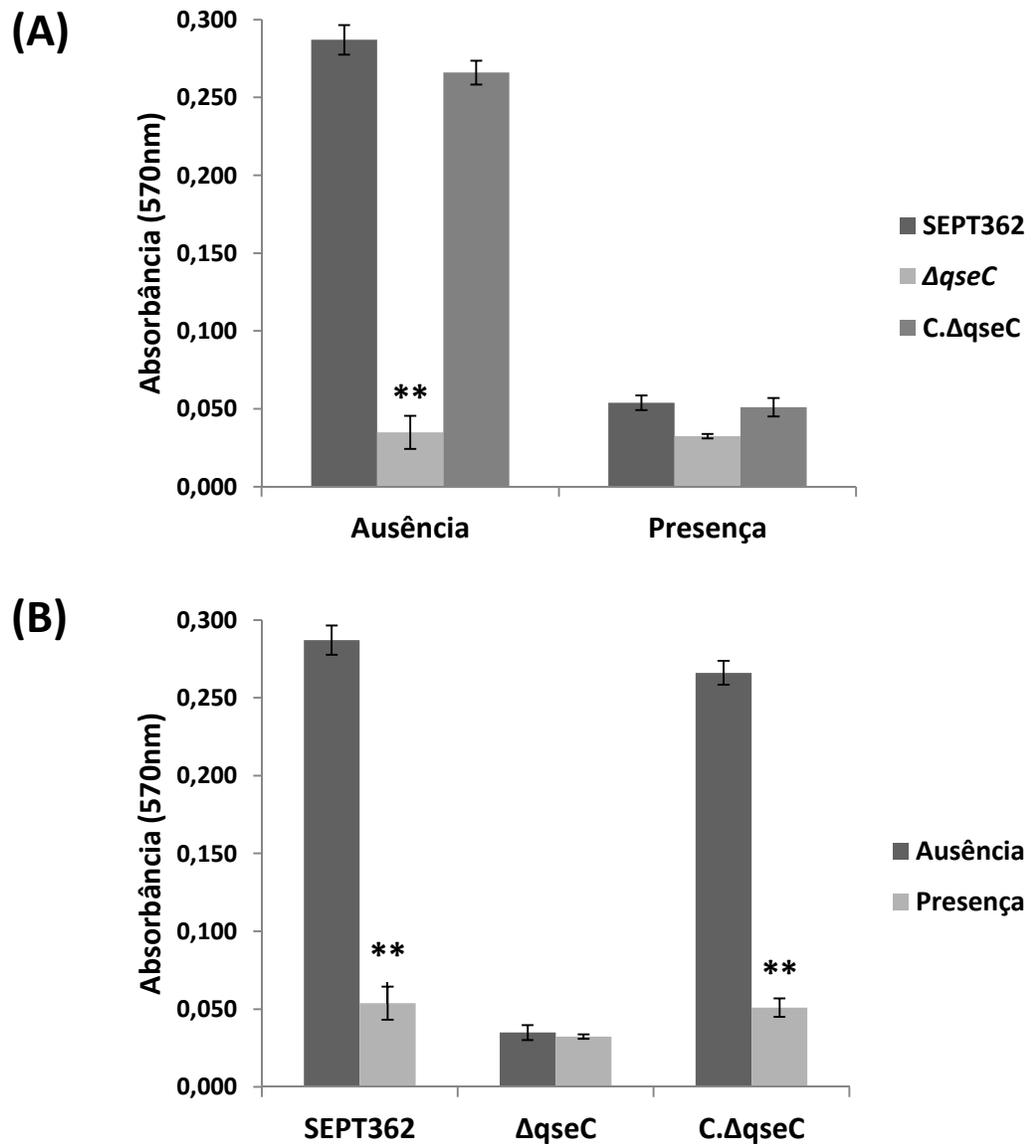


Figura 38 - Quantificação da adesão à linhagem celular Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG) na ausência e na presença do análogo da manose methyl-alpha-D-mannopyranoside. (A) quantificação x ausência/presença; (B) quantificação x linhagens. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey em comparação com a linhagem selvagem (**, $p < 0,01$).

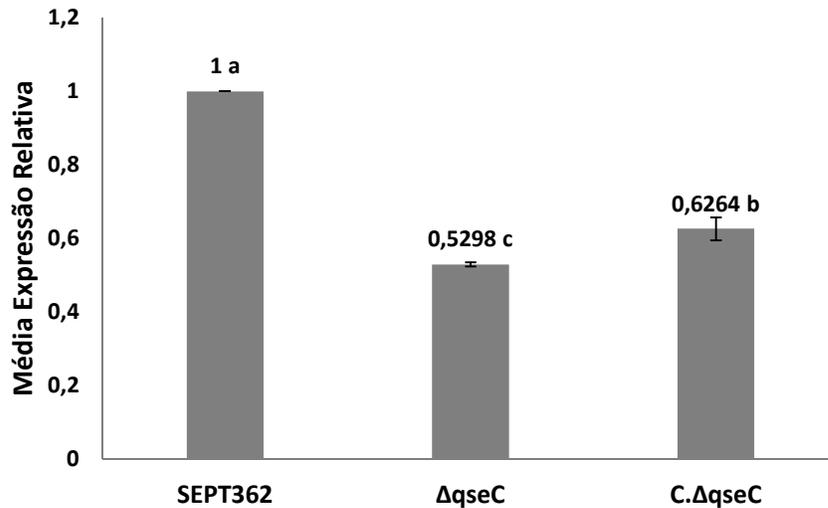


Figura 39 - Análise de expressão do gene *fimH* nas linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e C. $\Delta qseC$. Médias seguidas por letras diferentes são diferentes significativamente (Tukey, $p < 0,05$).

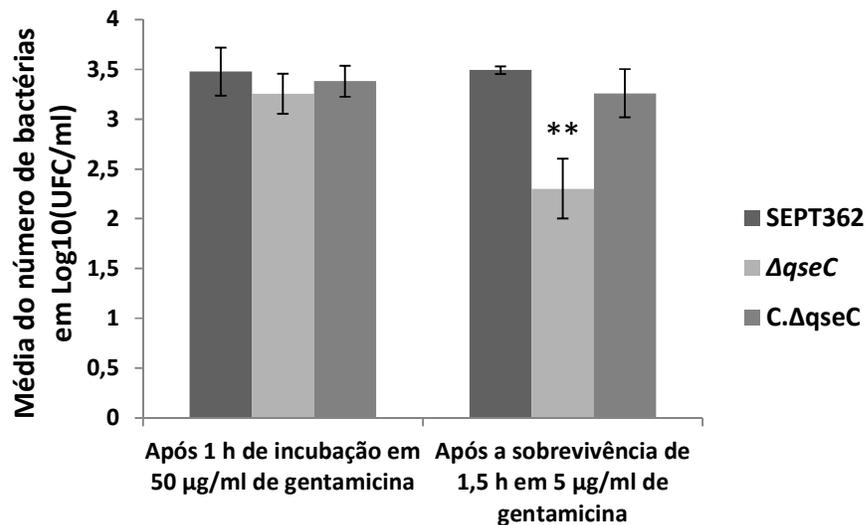


Figura 40 - Ensaio de invasão das linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e C. $\Delta qseC$ em células CEC-32. (A) Comparação entre as linhagens após 1 h de incubação com 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina e após sobrevivência de 1,5 h em 5 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. (B) Comparação entre os tempos de incubação. Diferença significativa determinada pelo teste de Tukey em comparação com a linhagem selvagem (**, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

6.4.3.7. Sobrevivência em macrófagos HD11

Os resultados mostraram que a linhagem mutante $\Delta qseC$ apresenta a mesma capacidade de sobrevivência intra-macrófono que as linhagens selvagem e complementada após 3 e 20 h de incubação (Figura 41). Esses dados sugerem que o $qseC$ não está envolvido na viabilidade intra-macrófono. Nenhuma contagem foi obtida para o controle *E. coli* HB101.

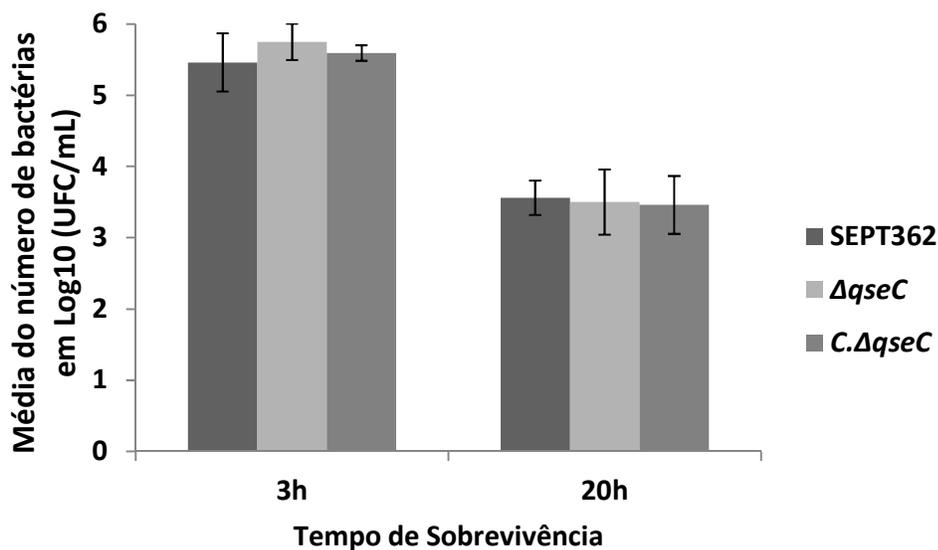


Figura 41 - Sobrevivência das linhagens SEPT362, $\Delta qseC$ e *C.* $\Delta qseC$ em macrófagos HD11 após 3 h e 20 h. Diferença não estatística determinada pelo teste de Tukey em comparação com a linhagem selvagem ($p > 0,05$).

7. Discussão

7.1. Mutação no gene *ychO* e os efeitos desta mutação

Linhagens APEC causam infecções extra-intestinais e são responsáveis por perdas econômicas significativas na indústria avícola no mundo todo (Gross, 1961; Janßen *et al.*, 2001). Colisepticemia é a doença sistêmica mais importante, afetando a qualidade do alimento e a segurança da saúde, porém seus principais mecanismos de virulência permanecem, em grande parte, descaracterizados (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Mellata *et al.*, 2003; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009) devido à grande diversidade genética presente nesse patotipo (Maturana *et al.*, 2011). Diferentes fatores de virulência de APEC já foram descritos, incluindo toxinas e citotoxinas, sistemas de aquisição de ferro, hemolisinas, adesinas e fatores envolvidos na resistência à fagocitose (Boyer *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2013; Kariyawasam, Johnson e Nolan, 2006; Ling *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013; Zhuge *et al.*, 2013). Neste estudo, foi demonstrado, pela primeira vez, que o gene *ychO*, na linhagem SEPT362, é expresso *in vivo* e *in vitro* e está envolvida na capacidade de adesão e invasão de células cultivadas *in vivo*, sobrevivência intra-macrófago, motilidade e formação de biofilme. Essas propriedades são importantes para a patogenicidade *in vivo*, e os resultados sugerem um papel significativo do gene *ychO* na patogenicidade da linhagem SEPT362 (Figura 12 a Figura 19).

Invasinas são uma classe de proteínas que permitem a entrada da bactéria em células do hospedeiro, normalmente pela forte aderência inicial, seguida de invasão das células eucarióticas (Isberg e Leong, 1990; Saltman *et al.*, 1996). Adesão e invasão são importantes passos para a patogênese bacteriana e contribuem para a colonização, persistência e disseminação do patógeno no organismo hospedeiro (Antão, Wieler e Ewers, 2009; Finlay, Ruschkowski e Dedhar, 1991; Meyer, Mintz e Fives-Taylor, 1997; Niemann, Schubert e Heinz, 2004). Desta maneira, entender o papel de uma invasina pode ajudar a elucidar os mecanismos de invasão e patogenicidade em células hospedeiras. O gene *ychO* codifica para uma proteína conhecida como uma invasina “putativa”. As análises feitas em nosso trabalho desmostraram que essa proteína contém uma

sequência de sinal N-terminal, um domínio β conservado, que forma uma estrutura β -barrel transmembrana, e um domínio de passagem C-terminal, que pode ser exportado para a parte externa da célula. Juntos, esses domínios são as principais características da superfamília intimina/invasina. As proteínas do tipo intimina/invasina formam, normalmente, uma estrutura longa, depois do domínio de passagem, composto de domínios repetidos semelhantes à da imunoglobulina (BID - *bacterial immunoglobulin-like domains*). Em alguns casos, domínios *C-type lectin-like* estão presentes na porção C-terminal (Hamburger *et al.*, 1999). Essas estruturas não são encontradas na proteína YchO da linhagem SEPT362.

Neste estudo, inicialmente, a expressão do gene *ycho* foi verificada na linhagem APEC SEPT362 cultivada *in vitro* e *in vivo* dentro de órgãos de aves, após inoculação. Os resultados mostraram que este gene é expresso, não apenas em condições de cultura, mas também no interior de pulmões e baço 24 e 48 horas após a inoculação. Com esses resultados, que indicam um possível papel *in vivo*, uma linhagem mutante para o gene *ycho* e uma linhagem complementada (gene selvagem em plasmídio na linhagem mutante) foram construídas para análise comparativa com a linhagem selvagem SEPT362 para que seu papel em funções biológicas e de patogenicidade pudesse ser estudado.

Biofilmes são comunidades multicelulares, com produção própria de matriz extracelular, aderidas a uma superfície (Beloin, Roux e Ghigo, 2008; Branda *et al.*, 2005). A matriz extracelular auxilia na resistência a alterações ambientais e contribui no escape às defesas do hospedeiro. Devido à linhagem SEPT362 aderir a poliestireno e formar biofilme (de Pace *et al.*, 2010), ensaios de formação de biofilme foram realizados. A linhagem mutante $\Delta ycho$ produziu menor quantidade de biofilme em poliestireno do que a linhagem selvagem, porém o complementado formou maior quantidade do que as outras linhagens, o que é explicado pela superexpressão do gene devido à sua natureza plasmidial e sugere a importância desta invasina na formação de biofilme. Esses resultados corroboram um trabalho anterior, onde uma invasina “putativa” similar de *Edwardsiella tarda* foi descrita como sendo essencial para a formação de biofilme (Dong *et al.*, 2013), embora esta apresente uma longa estrutura de BIDs repetida e a YchO, não.

A interação com a superfície é o primeiro passo para o estabelecimento do biofilme, e a motilidade é necessária para aumentar a oportunidade de a bactéria interagir com as superfícies

(Wood *et al.*, 2006). Os ensaios de motilidade mostraram que a falta do gene *ychO* diminui a motilidade, sugerindo que a diminuição da formação de biofilme pode ser influenciada por esta motilidade debilitada (Wood *et al.*, 2006). Porém, a motilidade no complementado não foi totalmente restaurada, isso pode dever-se à alta expressão do gene nesta linhagem que, provavelmente, altera de alguma maneira este fenótipo. Para verificar se esses resultados ocorreram devido a uma alteração na expressão de genes de flagelo, verificamos, por qRT-PCR, a expressão dos genes *fliC*, *flhD*, *motA* e *flgE*, porém nenhuma diferença foi encontrada na expressão destes entre as linhagens selvagem, mutante e complementada. Dessa forma, a alteração da motilidade pode ser explicada por um provável desarranjo da membrana resultante da mutação e/ou da complementação, alterando a capacidade de motilidade.

A adesão a células hospedeiras é essencial para a patogênese de *E. coli* pois considera-se esta capacidade como o primeiro passo para a colonização e posterior invasão em patógenos invasivos (Antão, Wieler e Ewers, 2009; Meyer, Mintz e Fives-Taylor, 1997; Niemann, Schubert e Heinz, 2004). Neste trabalho, foi demonstrado que nos ensaios de adesão em células FEG a adesão do mutante foi significativamente menor que aquela apresentada pela linhagem selvagem, e que a adesão é restaurada na linhagem complementada. Devido ao fato de a Fímbria do tipo 1 ser importante para a adesão às células epiteliais de aves pela sua capacidade em ligar-se a resíduos de D-manose (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002; Boudeau, Barnich e Darfeuille-Michaud, 2001; Khan *et al.*, 2007), os ensaios de adesão também foram realizados na presença de *alpha-D-mannopyranoside*, um análogo da D-manose, não metabolizável pela bactéria, para verificar se a diminuição da aderência foi resultado de um distúrbio na expressão da fímbria do tipo 1, ou não. Nestes ensaios, a linhagem mutante também demonstrou uma diminuição significativa na adesão bacteriana, e pudemos verificar que a alteração não tem relação à expressão da fímbria do tipo 1. A linhagem complementada também restaurou a capacidade de adesão nessa condição. Para investigar se essa alteração teria relação com algum desbalanço na expressão de outros genes que existem nesta linhagem e que podem ser importantes para a adesão em APEC, experimentos de expressão gênica foram realizados. O qRT-PCR dos genes de adesinas manose resistente mostraram que os níveis de expressão de *ecp* (*E. coli* common pilus), *csgA* (Fímbria curli), *lpfA* (*long polar fimbria subunit A*), *aatA* (autotransportadora) e *aatB* (autotransportadora) (Krogfelt, Bergmans e Klemm, 1990; Rendón *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Zhuge *et al.*, 2013), presentes na linhagem SEPT362 (Rojas *et al.*, 2013) não foram diferentes entre as linhagens. Dessa forma,

nenhum desses genes, importantes para a adesão de APEC, são influenciados pela falta do gene *ychO*, e a diminuição da aderência do mutante não é devido à diminuição da expressão destes genes. Desta maneira, apesar da ausência dos BIDs e dos domínios C-type lectin-like (Li *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2012), o gene *ychO* afeta a capacidade de adesão da linhagem APEC SEPT362, característica comum às invasinas.

Bactérias do tipo APEC, após estabelecer a infecção na via aérea, disseminam-se sistematicamente em outras partes do corpo. No trato respiratório de aves de corte, as células imunológicas inatas, como os heterófilos, que são os primeiros na linha de defesa contra microrganismos invasores, seguidos pelos macrófagos, migram para os sacos aéreos. Os macrófagos apresentam diversos receptores para reconhecer e, em seguida, fagocitar e matar bactérias (Ficken e Barnes, 1989; Qureshi, Heggen e Hussain, 2000; Toth, Siegel e Veit, 1987). Por outro lado, as bactérias patogênicas também desenvolveram mecanismos e fatores de virulência para escapar e resistir à ação de macrófagos e heterófilos (Qureshi, Heggen e Hussain, 2000). Muitas bactérias que causam doenças sistêmicas, incluindo a SEPT362, são capazes de sobreviver dentro de macrófagos (de Pace *et al.*, 2010). Nos ensaios de sobrevivência intramacrófagos (células HD11), a linhagem mutante $\Delta ychO$ mostrou uma diminuição na sobrevivência nas primeiras 3 horas, enquanto a linhagem complementada restaurou esta capacidade. Embora a diminuição da sobrevivência tenha sido significativa, esta não foi totalmente abolida, provavelmente devido à existência de outros genes que podem, potencialmente, colaborar neste processo: *zwf* (*glucose 6-phosphate dehydrogenase*), *bfr* (*bacterioferrin*), *fieF* (*ferrous iron efflux protein F*), *fimX* (*type 1 fimbriae regulator*), *norV* (*flavorubredoxin oxidoreductase*), *htrA* (*serine endoprotease*), *dsbA* (*periplasmatic protein disulfide isomerase I*), *hfq* (*RNA-binding protein Hfq*), entre outros (Bateman e Seed, 2012; Poirier *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2012; Smith, Thompson e Clarke, 2013). Após 20 horas, a linhagem mutante manteve a mesma sobrevivência que as outras linhagens. Estes dados sugerem que o gene *ychO* está envolvido na replicação e viabilidade dentro de macrófagos, durante os primeiros estágios de sobrevivência.

A potencial contribuição do gene *ychO* para a invasão de fibroblasto de embrião de galinha (CEC-32) (linhagem celular derivada de aves e que, portanto, representa modelo no processo de reconhecimento patógeno-hospedeiro) também foi investigada. Os resultados

mostraram que a linhagem mutante $\Delta ychO$ apresentou menor quantidade de células viáveis intra-fibroblastos do que a linhagem selvagem, enquanto que a linhagem complementada restaurou a quantidade de células viáveis. A diminuição da capacidade de invasão foi significativa, porém não foi totalmente abolida, o que ocorre devido à existência de outros genes que também contribuem para este processo, como *fliC* (*flagellin*), *motA* (*flagellar motor protein*), *bamB* (*outer membrane biogenesis protein*), *ompA* (*outer membrane protein A*), *ibeB* (*invasion protein*), entre outros (Duan *et al.*, 2013; Smith, Thompson e Clarke, 2013; Wang *et al.*, 2012). Após 1,5 horas extra de sobrevivência intra fibroblasto o número de bactérias viáveis mutantes diminuiu, enquanto que as linhagens selvagem e complementada mantiveram sua viabilidade. Esses dados sugerem que esta proteína tem papel não apenas na invasão, mas também na sobrevivência dentro de células.

Além disso, em infecção de pintos de um dia de idade, a falta do gene *ychO* reduziu a virulência da linhagem SEPT362 após o terceiro dia de infecção, mudando o perfil de mortalidade da linhagem mutante. A linhagem complementada exibiu um potencial de mortalidade similar ao da linhagem selvagem, indicando que o gene *ychO* está envolvido no processo de patogenicidade desta linhagem APEC.

Sabe-se que a patogênese de linhagens APEC é controlada por um grande número de fatores de virulência, incluindo adesinas (F1-, P-, AC/I-, fímbria F17, fímbria *curli* e adesinas afimbriais), sistemas de captação de ferro (aerobactina e yersiniabactina), hemolisinas e hemaglutininas sensíveis à temperatura (Tsh), fatores antibactericidas (proteína da membrana externa A, proteína para o aumento da sobrevivência em soro do hospedeiro, lipopolissacarídeos, cápsula K1 e produção de colicina) e toxinas (toxina estável ao aquecimento, cito-/vero-toxina, toxina flagelar e toxina vacuolar autotransportadora) (Amabile de Campos *et al.*, 2005; Dhouloulin e Fairbrother, 1999; Dozois, Daigle e Curtiss, 2003; Janßen *et al.*, 2001; Kariyawasam, Johnson e Nolan, 2006; Knöbl *et al.*, 2006; Kostakioti e Stathopoulos, 2004; McPeake, Smyth e Ball, 2005; Mellata *et al.*, 2003; Parreira e Gyles, 2002). Muitos destes fatores de virulência (*fimH*, *tshH*, *fliC*, *icmF*, *iucC*, *yoeB*, entre outros) estão presentes na linhagem SEPT362 (de Pace *et al.*, 2011, 2010; Rojas *et al.*, 2013), que torna mais provável que a patogenicidade desta linhagem seja multifatorial. Dessa maneira, a atividade de *ychO* é uma das muitas que podem

contribuir para a patogenicidade da linhagem SEPT362, e toda a virulência observada nessa linhagem deve resultar da soma de todos os fatores de virulência presentes nela.

Com os resultados apresentados neste trabalho somados a presença das três estruturas básicas da proteína (peptídeo sinal, β -Barrel e domínio de passagem), podemos confirmar o papel da proteína YchO como uma invasina. Apesar de sua curta estrutura de passagem, sem as repetições de BID, a invasina *ychO* é importante para a patogenicidade da APEC SEPT362. A falta deste gene provocou a diminuição da formação de biofilme e uma menor motilidade. Esta invasina contribui não só com a adesão e invasão, mas também com a sobrevivência em células hospedeiras. Esses resultados, juntamente com a diminuição da mortalidade em aves de um dia de vida infectados com o mutante, nos leva a propor que a YchO é um fator de virulência na linhagem SEPT362.

7.2. Mutação no gene *luxS* e os efeitos desta mutação

Quorum sensing (QS) consiste na coordenação da expressão gênica em resposta à densidade da população celular através da comunicação entre as células, por meio de autoindutores sintetizados e secretados pelas próprias células bacterianas (Fuqua, Winans e Greenberg, 1994). O gene *luxS* é necessário para a produção do autoindutor 2 (AI-2), molécula sinalizadora do sistema de QS AI-2. Apesar de esse fenômeno estar presente em *E. coli*, sua participação no fenótipo de linhagens aviárias (APEC) ainda não está totalmente estabelecida.

Neste estudo foi demonstrado que o gene *luxS* é expresso *in vivo* e *in vitro* e está envolvido na capacidade de adesão em células cultivadas *in vitro*. Porém, não tem influência na invasão de células *in vitro*, na sobrevivência intra-macróforo, na motilidade, na formação de biofilme, na avaliação de infecção sistêmica e também não altera a patogenicidade da linhagem SEPT362 (Figura 24 a Figura 30). Não existem diferenças de crescimento entre as linhagens mutante, selvagem e complementada. No ensaio de formação de biofilme houve diferença significativa para a linhagem complementada, diferença que pode estar relacionada às diferenças nas dosagens gênicas, devido ao número de cópias do plasmídeo com elevada expressão do gene *luxS*.

Nos ensaios de adesão em células FEG a adesão do mutante foi significativamente menor que a linhagem selvagem na ausência do análogo da manose, enquanto que o complementado restaurou a adesão (Figura 27A). Na presença deste análogo, não houve diferença significativa na adesão deste tipo celular. A diferença significativa na adesão tanto da linhagem selvagem, quanto da mutante, quando se é adicionado o análogo da manose (Figura 27B), sugere que na linhagem mutante ocorre uma redução na expressão da fímbria do tipo 1, de forma a reduzir a adesão. A fímbria do tipo 1 é uma fibra adesiva, de estrutura composta, que apresenta uma pequena ponta de estrutura fibrilar contendo as subunidades FimG, FimF e FimH, que fazem parte de uma haste composta predominantemente de FimA (Jones *et al.*, 1995). A adesina FimH é responsável por ligações com a célula hospedeira através de oligossacarídeos D-manose (Abraham, Goguen e Beachey, 1988; Krogh, Bergmans e Klemm, 1990). Dessa maneira, a expressão desta adesina foi estudada com a finalidade de se verificar se a diminuição da adesão no mutante *luxS* está ligada com a alteração da expressão da fímbria do tipo 1. Como resultado, foi possível constatar que a falta do gene *luxS* alterou a expressão dessa adesina.

Em *E. coli*, o receptor para o sistema AI-2 é a família transportadora ABC *lsr* (*LuxS-Regulated*), e a deleção e alguns de seus receptores alteram características fenotípicas, como por exemplo, a formação de biofilme (Rezzonico, Smits e Duffy, 2012). Porém, nem todas as alterações condizem com as desencadeadas pela deleção do gene *luxS*. Dessa forma, não se sabe, ao certo, se os fenótipos ocasionados pela deleção se dão pela falta de AI-2, ou pelas alterações de metabolismo pela disfunção do Ciclo do Metil Ativado (CMA), ou pela combinação de ambos (Walters, Sircili e Sperandio, 2006). Diferentes trabalhos foram realizados com a finalidade de se determinar se as características alteradas pela mutação neste gene foram causadas pela falta de AI-2 ou pela desestruturação do CMA.

No caso das EPEC e EHEC, ambas produzem uma lesão histopatológica característica conhecida como lesões *attaching and effacing* (A/E), sendo os genes responsáveis por essas lesões localizados na ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE). Embora EHEC e EPEC apresentem a mesma alteração em relação à motilidade, existem diferenças na regulação de LEE. A secreção de moléculas pelo sistema de secreção do tipo III, controlado por LEE, em mutante *luxS*, é eliminada em EHEC e apenas diminuída em EPEC, sugerindo diferentes regulações pelo sistema *QS* entre estas linhagens (Sircili *et al.*, 2004;

Sperandio *et al.*, 2001). EPEC coloniza o intestino delgado proximal, que apresenta pouca ou nenhuma flora residente, enquanto EHEC coloniza o intestino grosso, sendo o QS primariamente interespecífico durante a infecção por EHEC, e intraespecífico durante a infecção por EPEC (Sircili *et al.*, 2004), mostrando que as diferenças encontradas poderiam ocorrer devido a variações genéticas entre as linhagens. Sperandio *et al.* (2003) verificaram que, em EHEC, as alterações de expressão do LEE eram devidas à redução da produção do AI-3, o real regulador desses genes, que apresentava produção alterada devido a mudanças metabólicas ocasionadas pela falta do CMA. No entanto, Wang *et al.* (2012) demonstraram, através da expressão da enzima recombinante SAH hidrolase (SahH) de *Pseudomonas aeruginosa* e do gene *luxS* em um mutante *E. coli* K-12 para o gene *luxS*, que as alterações na motilidade e formação de biofilme desse mutante não foram causadas pela disfunção no CMA.

O gene *luxS* tem sido muito estudado nas duas últimas décadas porém, diferentes alterações desencadeadas pela mutação neste gene foram descritas. Por exemplo, Ling *et al* (2010) mostraram que em *E. coli* K-12, a deleção do gene *luxS* aumenta, significativamente, a motilidade do tipo *swimming*, devido ao aumento na síntese de flagelos, enquanto que em EPEC (Sircili *et al.*, 2004) e em EHEC (Sperandio *et al.*, 2001) há uma diminuição significativa desta mesma atividade. Os resultados encontrados em nosso estudo mostram que não há diferença significativa entre as linhagens selvagem e mutante, nesta mesma característica.

A construção de um mutante *luxS* por Wang *et al.* (2005), em uma linhagem *E. coli* K-12 W3110 não alterou o crescimento, a motilidade, ou a formação de biofilme, quando comparado à linhagem selvagem, resultados que contradizem com aqueles obtidos em EHEC por Sperandio *et al.* (2001). A explicação, até então, eram as diferenças genéticas entre as duas linhagens estudadas. Porém, Haigh *et al.* (2013) determinaram que a estratégia utilizada ao se criar o mutante, e a linhagem utilizada para analisar o efeito da mutação *luxS*, influenciam no fenótipo final observado. Os resultados obtidos no presente trabalho, com a mutação *luxS*, corroboram os obtidos por Wang *et al.* (2005), não se observando diferenças no crescimento, na motilidade, ou na formação de biofilme.

Han *et al.* (2012) estudaram os efeitos da mutação *luxS* na linhagem APEC DE17, isolada de pato com sinais clínicos de septicemia. Como resultados, verificaram redução na motilidade, na formação de biofilme, na patogenicidade, na infecção sistêmica e na capacidade de

adesão e invasão em fibroblasto. Palaniyandi *et al.* (2013) mostram que o mutante *luxS* da linhagem APEC O78:K80:H9, isolada de fígado de peru, reduziu a invasão em fibroblasto, a sobrevivência em macrófagos, a invasão de órgãos internos e a letalidade de embrião de galinha. No presente trabalho, apenas a capacidade de adesão manose-sensível foi reduzida, sendo diferente dos dois trabalhos citados. Seguindo a mesma linha de Haigh *et al.* (2013), as diferenças encontradas em nossos resultados podem estar relacionadas às diferenças nas formas de construção do mutante e, principalmente, diferenças genéticas entre as linhagens e nos modelos de análise verificados. Han *et al.* (2012) usaram como modelo animal pato, que pode apresentar uma maior susceptibilidade a uma determinada APEC diferente daquela que seria observada em galinhas e Palaniyandi *et al.* (2013) utilizaram como modelo biológico de estudo, embriões de galinhas, os quais, devido à imaturidade apresentam sistema imunológico ainda não desenvolvido.

Apesar dos inúmeros trabalhos publicados, com diferentes resultados encontrados, sobre o sistema *QS* AI-2 em *Escherichia coli*, as relações entre o gene *luxS* nas características fenotípicas e na patogenicidade ainda não estão bem elucidadas. Em APEC, nosso trabalho, é um dos primeiros a estudar a ação de sistemas *QS*, sendo os resultados encontrados importantes para determinar a função deste tipo de regulação neste grupo de linhagens patogênicas de *E. coli*, bem como na ação do mesmo sobre os mecanismos de patogenicidade. Os resultados, aqui encontrados, indicam que a mutação no gene *luxS* apesar de diminuir significativamente a adesão, não altera a patogenicidade na linhagem SEPT362.

7.3. Mutação no gene *qseC* e os efeitos desta mutação

O gene *qseC* é necessário para a produção do QseC, o sensor histidina quinase do sistema de *QS* AI-3, que na presença de AI-3, ou catecolaminas, ativam os reguladores de resposta QseB, KdpE e QseF, que por sua vez regulam diversas funções (Clarke *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2009). Apesar desse fenômeno estar presente em *E. coli*, sua participação no fenótipo de linhagens aviárias (APEC) ainda não está estabelecida.

Neste estudo, foi demonstrado que o gene *qseC* é expresso *in vivo* e *in vitro* e está envolvido na capacidade de adesão e invasão de células cultivadas *in vitro* e na patogenicidade da linhagem SEPT362. Porém, não está envolvido na sobrevivência intra-macróforo, na motilidade,

e na formação de biofilme, nas condições testadas. Não existem diferenças de crescimento entre as linhagens mutante, selvagem e complementada.

A capacidade das linhagens de aderir às células FEG foi avaliada para entender as possíveis influências do sistema AI-3 nesse fenótipo. Nós mostramos que nos ensaios de adesão em células FEG a adesão do mutante foi significativamente menor que a adesão apresentada pela linhagem selvagem, na ausência do análogo da D-manose (Figura 38A), e que a linhagem complementada restaurou a adesão. Na presença do mesmo, não houve diferença significativa entre as três linhagens (Figura 38A). Como não existe diferença significativa na adesão da linhagem mutante quando se é adicionado o análogo da manose, e existe diferença para as linhagens selvagem e complementada (Figura 38B), sugerimos que na linhagem mutante há uma alteração na expressão da fímbria do tipo 1, de forma a diminuir ou abolir a adesão pela fímbria do tipo 1. Dessa forma, a expressão de *fimH* foi avaliada com a finalidade de se verificar se o gene *qseC* funciona como um regulador deste gene. Como resultado, o mutante para o gene *qseC* reduziu quase que pela metade a expressão deste gene. Em UPEC, o mutante $\Delta qseC$ diminuiu a expressão dos componentes da fímbria do tipo 1, porém não abole totalmente (Kostakioti *et al.*, 2012, 2009). Isto indica que o *qseC* tem influência na regulação da expressão dos componentes da fímbria do tipo 1, porém não explica o porque a fímbria do tipo 1 parece não estar presente na linhagem mutante no ensaio de adesão. Uma possível explicação para este fenômeno é a existência de alguma alteração no processo de montagem da fímbria.

Nos ensaios de invasão de fibroblasto de embrião de galinha (CEC-32), o mutante $\Delta qseC$ manteve o número de células viáveis intra-fibroblasto em comparação à linhagem selvagem (Figura 40A), indicando que este gene não tem relação com a invasão nesta linhagem. Após 1,5 horas de avaliação de sobrevivência, o número de bactérias viáveis de $\Delta qseC$ diminuiu, enquanto que a linhagem selvagem manteve sua viabilidade (Figura 40B). Este número foi restaurado na linhagem complementada. Esses dados sugerem que o gene *qseC* não tem papel na invasão, mas participa na capacidade de sobrevivência intracelular neste tipo celular.

Além disso, em experimentos com infecção de pintos de um dia de idade, a falta do gene *qseC* levou a uma redução da virulência da linhagem SEPT362. A linhagem complementada exibiu um potencial de mortalidade similar ao da linhagem selvagem, indicando que o gene *qseC* influencia na patogenicidade da APEC.

O gene *qseC* tem sido descrito como sendo um ativador de virulência, pois regula positivamente a motilidade em EHEC, UPEC e *Salmonella*, a invasão em *Salmonella* e, em EHEC, regula a expressão dos genes da ilha de patogenicidade LEE (Clarke *et al.*, 2006; Clarke e Sperandio, 2005; Hughes *et al.*, 2009; Njoroge e Sperandio, 2012; Walters, Sircili e Sperandio, 2006) que codificam para componentes estruturais do sistema de secreção do tipo III e de efetores transportados por este sistema; regula, também, a expressão de genes, como o EspFu e o NleA, transportados por este sistema e que não são codificados no locus LEE (Campellone, Robbins e Leong, 2004; Gruenheid *et al.*, 2004; Jarvis *et al.*, 1995; McDaniel *et al.*, 1995), presentes na cascata de regulação de QseC (Figura 4). A linhagem estudada neste trabalho não apresenta a ilha de patogenicidade LEE, ou seja, não apresentando o sistema de secreção do tipo III, o que explica algumas diferenças encontradas nos resultados deste trabalho. Estes resultados sugerem que a regulação do QseC em APEC ocorra de maneira diferente, sendo necessários novos estudos de forma a elucidar sua cascata de regulação e explicar as diferenças encontradas na regulação da motilidade. Em APEC, nenhum trabalho foi, ainda, realizado para elucidar a regulação do gene *qseC*. Entender a regulação adrenérgica de uma bactéria é uma abordagem poderosa para estudar os mecanismos de estresse e sobrevivência celular (Hughes *et al.*, 2009). Os resultados aqui apresentados mostram que o gene *qseC* tem papel adesão e patogenicidade da linhagem SEPT362, através da regulação da expressão e da montagem da fímbria do tipo 1.

8. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir:

- O gene *ychO* apresenta papel na adesão e invasão de células *in vitro*, sendo considerada uma invasina. Além disso, sua falta afeta a motilidade, a formação de biofilme, sobrevivência intra-macrófagos e na patogenicidade da APEC SEPT362, sendo um fator de virulência para esta linhagem.
- O gene *luxS* está envolvido na adesão a células *in vitro*, fazendo parte da regulação a expressão de componentes da Fímbria do tipo 1, porém sem alterar a patogenicidade da linhagem SEPT362.
- O gene *qseC* regula a adesão pela Fímbria do tipo 1, através da expressão de seus componentes e sua montagem, e tem papel na sobrevivência em fibroblasto e na patogenicidade da linhagens SEPT362.

9. Perspectivas

A caracterização de novas invasinas e adesinas ajuda a conhecer melhor os mecanismos de patogenicidade de APEC e entender melhor sua regulação, possibilitando novos alvos para a construção de vacinas.

Estudos futuros deverão aprimorar o conhecimentos do papel de sistemas de *quorum sensing* na patogênese de linhagens APEC. A análise comparativa da expressão gênica global (RNAseq) das linhagens selvagem e mutante poderia verificar alterações na transcrição provocadas pela falta dos gene *luxS* e *qseC*, com a finalidade de se determinar as vias e genes afetados direta, e indiretamente, por estes sistemas. Dessa forma, esperamos poder revelar possíveis genes/proteínas que possam atuar como alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

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.

ABRAHAM, S. N.; GOGUEN, J. O. N. D.; BEACHEY, E. H. Hyperadhesive mutant of Type 1 fimbriated *Escherichia coli* associated with formation of FimH organelles (Fimbriosomes). **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1023-1029, 1988.

ALFARO, J. F.; ZHANG, T.; WYNN, D. P.; KARSCHNER, E. L.; ZHOU, Z. S. Synthesis of LuxS inhibitors targeting bacterial cell-cell communication. **Organic letters**, v. 6, n. 18, p. 3043–6, 2004.

AMABILE DE CAMPOS, T.; STEHLING, E. G.; FERREIRA, A.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; BROCCHI, M.; DIAS DA SILVEIRA, W. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesion-related genes of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary microbiology**, v. 106, n. 3-4, p. 275–85, 2005.

ANTÃO, E.-M.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut pathogens**, v. 1, n. 22, p. 22, 2009.

BACA-DELANCEY, R. R.; SOUTH, M. M. T.; DING, X.; RATHER, P. N. *Escherichia coli* genes regulated by cell-to-cell signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 8, p. 4610–4614, 1999.

BAHRANI-MOUGEOT, F. K.; BUCKLES, E. L.; LOCKATELL, C. V; HEBEL, J. R.; JOHNSON, D. E.; TANG, C. M.; DONNENBERG, M. S. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1079–1093, 2002.

BALESTRINO, D.; HAAGENSEN, J. A. J.; RICH, C.; FORESTIER, C. Characterization of type 2 *Quorum sensing* in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.8, p.2870-2880, 2005.

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.

BASSLER, B. L.; GREENBERG, E. P.; STEVENS, A. M. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 12, p. 4043–4045, 1997.

BASSLER, B. L.; LOSICK, R. Bacterially speaking. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 237–246, 2006.

- BATEMAN, S. L.; SEED, P. C. Epigenetic regulation of the nitrosative stress response and intracellular macrophage survival by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 83, n. 5, p. 908–25, 2012.
- BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. D. The role of the QseC *quorum sensing* sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial pathogenesis**, v. 44, n. 4, p. 271–8, 2008.
- BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.-M. *Escherichia coli* biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 249–289, 2008.
- 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.
- BLACKWELL, H. E.; FUQUA, C. Introduction to Bacterial Signals and Chemical Communication. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 1, p. 1–3, 2011.
- BODOR, A.; ELXNAT, B.; THIEL, V.; SCHULZ, S.; WAGNER-DOBLER, I. Potential for *luxS* related signalling in marine bacteria and production of autoinducer-2 in the genus *Shewanella*. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 13, 2008.
- BOUDEAU, J.; BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1272–1284, 2001.
- BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y.; ATTREE, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**, v. 10, n. 104, 2009.
- BRANDA, S. S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20–26, 2005.
- CAMPELLONE, K. G.; ROBBINS, D.; LEONG, J. M. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Developmental cell**, v. 7, n. 2, p. 217–228, 2004.
- 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.
- CLARKE, M. B.; HUGHES, D. T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E. C.; SPERANDIO, V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 27, p. 10420–10425, 2006.

- CLARKE, M. B.; SPERANDIO, V. Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and σ 28 (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1734–1749, 2005.
- COLLINSON, S. K.; DOIG, P. C.; DORAN, J. L.; CLOUTHIER, S.; TRUST, T. J.; KAY, W. W. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 12–8, jan. 1993.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6640–6645, 2000.
- DELISA, M. P.; VALDES, J. J.; BENTLEY, W. E. Mapping stress-induced changes in autoinducer ai-2 production in chemostat-cultivated *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2918–2928, 2001.
- DELISA, M. P.; WU, C.; WANG, L.; JAMES, J.; BENTLEY, W. E.; LISA, M. P. D. E.; VALDES, J. J. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated *quorum sensing* in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5239–5247, 2001.
- DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary research**, v. 30, n. 2-3, p. 299–316, 1999.
- DIAS DA SILVEIRA, W.; FERREIRA, A.; BROCCHI, M.; MARIA DE HOLLANDA, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; TATSUMI YAMADA, A.; LANCELLOTTI, M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. **Veterinary microbiology**, v. 85, n. 1, p. 47–53, 2002.
- DONG, X.; FAN, X.; WANG, B.; SHI, X.; ZHANG, X. H. Invasin of *Edwardsiella tarda* is essential for its haemolytic activity, biofilm formation and virulence towards fish. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 12–19, 2013.
- DOZOIS, C. M.; DAIGLE, F.; CURTISS, 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 of the United States of America**, v. 100, n. 1, p. 247–52, 2003.
- DOZOIS, C. M.; POURBAKHS, S. A.; FAIRBROTHER, J. M. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. **Veterinary microbiology**, v. 45, n. 4, p. 297–309, 1995.
- DRASAR, B. S.; HILL, J. **Human Intestinal Flora**. Academic Press, 1974.
- DROUAL, R.; WOOLCOCK, P. R. Swollen head syndrome associated with *E. coli* and infectious bronchitis virus in the Central Valley of California. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 23, n. 4, p. 733–42, 1994.

DUAN, Q.; ZHOU, M.; LIANG, H.; ZHU, X.; GUO, Z.; LI, Y.; HARDWIDGE, P. R.; ZHU, G. Contribution of flagellin subunit FliC to piglet epithelial cells invasion by F18ab *E. coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 1–2, p. 220–224, 2013.

ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y.; LAI, L.-C.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1–4, 1998.

EWERS, C.; JANSSEN, T.; KIESSLING, S.; PHILIPP, H.-C.; WIELER, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary microbiology**, v. 104, n. 1-2, p. 91–101, 2004.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIEBLING, S.; ALT, K.; ANTÁO, 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, n. 3, p. 163–176, 2007.

FAIRMAN, J. W.; DAUTIN, N.; WOJTOWICZ, D.; LIU, W.; NOINAJ, N.; BARNARD, T. J.; UDHO, E.; PRZYTYCKA, T. M.; CHEREZOV, V.; BUCHANAN, S. K. Crystal structures of the outer membrane domain of intimin and invasins from enterohemorrhagic *E. coli* and Enteropathogenic *Y. pseudotuberculosis*. **Structure**, v. 20, n. 7, p. 1233–1243, 2012.

FICKEN, M. D.; BARNES, H. J. Acute airsacculitis in turkeys inoculated with *Pasteurella multocida*. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 3, p. 231–237, 1989.

FINLAY, B. B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 99, n. 2, p. 283–296, 1991.

FRANKEL, G.; CANDY, D. C.; EVEREST, P.; DOUGAN, G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 5, p. 1835–42, 1994.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular microbiology**, v. 30, n. 5, p. 911–21, 1998.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. *Quorum sensing* in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269–275, 1994.

GALLOWAY, W. R. J. D.; HODGKINSON, J. T.; BOWDEN, S. D.; WELCH, M.; SPRING, D. R. *Quorum sensing* in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 *quorum sensing* pathways. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 1, p. 28–67, 2010.

- GANIN, H.; TANG, X.; MEIJLER, M. M. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa quorum sensing* by AI-2 analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 14, p. 3941–3944, 2009.
- GAO, Q.; XU, H.; WANG, X.; ZHANG, D.; YE, Z.; GAO, S.; LIU, X. RfaH promotes the ability of the avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058 to cause avian colibacillosis. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 11, p. 2474–80, 2013.
- GONZÁLEZ BARRIOS, A. F.; ZUO, R.; HASHIMOTO, Y.; YANG, L.; BENTLEY, W. E.; WOOD, T. K. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility *quorum-sensing* regulator (MqsR, B3022). **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 1, p. 305–316, 2006.
- GRASSL, G. A.; BOHN, E.; MÜLLER, Y.; BÜHLER, O. T.; AUTENRIETH, I. B. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasins beyond invasion. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 293, n. 1, p. 41–54, 2003.
- GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 22–26, 2008.
- GROSS, W. B. The Development of “Air Sac Disease.” **Avian Diseases**, v. 5, n. 4, p. 431–439, 1961.
- _____. Collibacillosis. In: CALNEK, B. W. *et al.* (Eds.). **Diseases of poultry**. 9. ed. Iowa State University Press, Ames, 1991. p. 138–144.
- GROSS, W. G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: ***Escherichia coli* in domestic animals and humans**. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 1994. p. 237–259.
- GRUENHEID, S.; SEKIROV, I.; THOMAS, N. A.; DENG, W.; DONNELL, P. O.; GOODE, D.; LI, Y.; FREY, E. A.; BROWN, N. F.; METALNIKOV, P.; PAWSON, T.; ASHMAN, K.; FINLAY, B. B. Identification and characterization of NleA, a non-LEE- encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 1233–1249, 2004.
- HAIGH, R.; KUMAR, B.; SANDRINI, S.; FREESTONE, P. Mutation design and strain background influence the phenotype of *Escherichia coli luxS* mutants. **Molecular Microbiology**, p. 951-69, 2013.
- HAMBURGER, Z. A.; BROWN, M. S.; ISBERG, R. R.; BJORKMAN, P. J. Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. **Science**, v. 286, n. 5438, p. 291–295, 1999.
- HAN, X.; BAI, H.; LIU, L.; DONG, H.; LIU, R.; SONG, J.; DING, C.; QI, K.; LIU, H.; YU, S. The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 55, n. 0, p. 21–27, 2012.

- HAN, Y.; HOU, S.; SIMON, K. A.; REN, D.; LUK, Y.-Y. Identifying the important structural elements of brominated furanones for inhibiting biofilm formation by *Escherichia coli*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 1006–1010, 2008.
- HUGHES, D. T.; CLARKE, M. B.; YAMAMOTO, K.; RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. The QseC adrenergic signaling cascade in Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). **PLoS Pathog**, v. 5, n. 8, 2009.
- HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 11–25, 1992.
- ISBERG, R. R.; LEONG, J. M. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. **Cell**, v. 60, n. 5, p. 861–71, 1990.
- ISBERG, R. R.; VOORHIS, D. L.; FALKOW, S. Identification of invasins: A protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. **Cell**, v. 50, n. 5, p. 769–778, 1987.
- 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. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 378, p. 371–378, 2001.
- JANSSENS, J. C. A.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; COSTER, D. DE; VERHOEVEN, T. L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; VOS, D. E. DE; KEERSMAECKER, S. C. J. DE. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6639–6648, 2008.
- JARVIS, K. G.; GIRÓN, J. A.; JERSE, A. E.; MCDANIEL, T. K.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7996–8000, 1995.
- JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7839–43, 1990.
- JONES, C. H.; PINKNER, J. S.; ROTH, R.; HEUSER, J.; NICHOLS, A. V.; ABRAHAM, S. N.; HULTGREN, S. J. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 2081–5, 1995.

KAADEN, O. R.; LANGE, S.; STIBUREK, B. Establishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32. *In vitro*, v. 18, n. 10, 1982.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Micro**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KAPER, J. B.; SPERANDIO, V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3197–3209, 2005.

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. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 744–749, 2006.

KHAN, N. A.; KIM, Y.; SHIN, S.; KIM, K. S. FimH-mediated *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 169–178, 2007.

KIEVIT, T. R. DE; IGLEWSKI, B. H. Bacterial *quorum sensing* in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4839–4849, 2000.

KNÖBL, T.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; GOMES, T. A.; VIEIRA, M. A.; FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. **Veterinary microbiology**, v. 83, n. 1, p. 71–80, 2001.

KNÖBL, T.; GOMES, T. A. T.; VIEIRA, M. A. M.; BOTTINO, J. A.; FERREIRA, A. J. P.; Occurrence of adhesin-encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeders with salpingitis and chicks with omphalitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 140–143, 2006.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; CUSUMANO, C. K.; HANNAN, T. J.; JANETKA, J. W.; HULTGREN, S. J. Distinguishing the contribution of type 1 pili from that of other QseB-misregulated factors when QseC is absent during urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 80, n. 8, p. 2826–34, 2012.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J. QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1020–31, 2009.

KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, 2004.

KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infection and immunity**, v. 58, n. 6, p. 1995–8, 1990.

- LEBEER, S.; KEERSMAECKER, S. C. J. DE; VERHOEVEN, T. L. A.; FADDA, A. A.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J. Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 860–871, 2007.
- LEE, J.; MAEDA, T.; HONG, S. H.; WOOD, T. K. Reconfiguring the *quorum-sensing* regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acylhomoserine lactones. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1703–16, 2009.
- LEE, W.-K.; OGURA, K.; LOH, J. T.; COVER, T. L.; BERG, D. E. Quantitative effect of *luxS* gene inactivation on the fitness of *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6615–6622, 2006.
- LI, J.; ATTLA, C.; WANG, L.; WOOD, T. K.; VALDES, J. J.; BENTLEY, W. E. *Quorum sensing* in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 16, p. 6011–6020, 2007.
- LI, M. F.; HU, Y. H.; ZHENG, W. J.; SUN, B. G.; WANG, C. L.; SUN, L. Inv1: an *Edwardsiella tarda* invasin and a protective immunogen that is required for host infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 4, p. 586–592, 2012.
- LING, H.; KANG, A.; TAN, M. H.; QI, X.; CHANG, M. W. The absence of the *luxS* gene increases swimming motility and flagella synthesis in *Escherichia coli* K12. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 401, n. 4, p. 521–526, 2010.
- LING, J.; PAN, H.; GAO, Q.; XIONG, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Aerobactin synthesis genes *iucA* and *iucC* contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058. **PloS one**, v. 8, n. 2, 2013.
- LOWERY, C. A.; DICKERSON, T. J.; JANDA, K. D. Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial *quorum sensing*. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 7, p. 1337–1346, 2008.
- LYTE, M.; ARULANANDAM, B. P. Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 128, n. 4, p. 392-398, 1996.
- LYTE, M.; ERICKSON, A. K.; ARULANANDAM, B. P.; FRANK, C. D.; CRAWFORD, M. A.; FRANCIS, D. H. Norepinephrine-induced expression of the K99 pilus adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 232, n. 3, p. 682–6, 1997.
- MARC, D.; ACN, E. Colonization ability and pathogenic properties of atim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.**, v. 149, p. 473–485, 1998.

MATTER, L. B.; BARBIERI, N. L.; NORDHOFF, M.; EWERS, C.; HORN, F. Avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 51–59, 2011.

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.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1664–1668, 1995.

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, 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. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p.536-540, 2003.

MEYER, D. H.; MINTZ, K. P.; FIVES-TAYLOR, P. M. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 8, n. 4, p. 389–409, 1997.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165–199, 2001.

MILLER, S. T.; XAVIER, K. B.; CAMPAGNA, S. R.; TAGA, M. E.; SEMMELHACK, M. F.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial *quorum-sensing* signal AI-2. **Molecular Cell**, v. 15, n. 5, p. 677–687, 2004.

NAKASHIMA, K.; SUGIURA, A; MOMOI, H.; MIZUNO, T. Phosphotransfer signal transduction between two regulatory factors involved in the osmoregulated *kdp operon* in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 6, n. 13, p. 1777–84, 1992.

NEALSON, K. H.; HASTINGS, J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 4, p. 496–518, 1979.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of Bacteriology**, v. 104, n. 1, p. 313–322, 1970.

NGELEKA, M.; BRERETON, L.; BROWN, G.; FAIRBROTHER, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity

of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. **Avian Diseases**, v. 46, n. 1, p. 143–152, 2002.

NHIEU, G. T. V.; KRUKONIS, E. S.; RESZKA, A. A.; HORWITZ, A. F.; ISBERG, R. R. Mutations in the cytoplasmic domain of the integrin beta1 chain indicate a role for endocytosis factors in bacterial internalization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 13, p. 7665–7672, 1996.

NIEMANN, H. H.; SCHUBERT, W.-D.; HEINZ, D. W. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 1, p. 101–112, 2004.

NJOROGE, J.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulation by two bacterial adrenergic kinases, QseC and QseE. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 2, p. 688–703, 2012.

PACE, F. DE; BOLDRIN DE PAIVA, J.; NAKAZATO, G.; LANCELLOTTI, M.; SIRCILI, M. P.; GUEDES STEHLING, E.; DIAS DA SILVEIRA, W.; SPERANDIO, V. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. **Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 2954–2962, 2011.

PACE, F. DE; NAKAZATO, G.; PACHECO, A.; BOLDRIN DE PAIVA, J.; SPERANDIO, V.; DIAS DA SILVEIRA, W. The Type VI Secretion System plays a role in type 1 fimbria expression and pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 4990–4998, 2010.

PALANIYANDI, S.; MITRA, A.; HERREN, C. D.; ZHU, X.; MUKHOPADHYAY, S. LuxS contributes to virulence in avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80:H9. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 567–575, 2013.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. **Veterinary microbiology**, v. 87, n. 4, p. 341–52, 2002.

____. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5087–5096, 2003.

PASSADOR, L.; COOK, J. M.; GAMBELLO, M. J.; RUST, L.; IGLEWSKI, B. H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**, v. 260, n. 5111, p. 1127–1130, 1993.

PEREIRA, C. S.; SANTOS, A. J. M.; BEJERANO-SAGIE, M.; CORREIA, P. B.; MARQUES, J. C.; XAVIER, K. B. Phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates detection and processing of the *quorum sensing* signal autoinducer-2. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 93–104, 2012.

POIRIER, K.; FAUCHER, S. P.; BÉLAND, M.; BROUSSEAU, R.; GANNON, V.; MARTIN, C.; HAREL, J.; DAIGLE, F. *Escherichia coli* O157:H7 survives within human macrophages: global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins. **Infection and immunity**, v. 76, n. 11, p. 4814–22, 2008.

POURBAKHS, S. A.; DHO-MOULIN, M.; BRÉE, A.; DESAUTELS, 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*. **Microbial pathogenesis**, v. 22, n. 6, p. 331–41, 1997.

QURESHI, M. A.; HEGGEN, C. L.; HUSSAIN, I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Developmental and comparative immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 103–19, 2000.

RAGIONE, R. M. LA; WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 27–35, 2002.

RASKO, D. A.; MOREIRA, C. G.; LI, D. R.; READING, N. C.; RITCHIE, J. M.; WALDOR, M. K.; WILLIAMS, N.; TAUSSIG, R.; WEI, S.; ROTH, M.; HUGHES, D. T.; HUNTLEY, J. F.; FINA, M. W.; FALCK, J. R.; SPERANDIO, V. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, v. 321, n. 5892, p. 1078–1080, 2008.

READING, N. C.; RASKO, D. A.; TORRES, A. G.; SPERANDIO, V. The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5889–94, 2009.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. *Quorum sensing*: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 1–11, 2006.

READING, N. C.; TORRES, A. G.; KENDALL, M. M.; HUGHES, D. T.; YAMAMOTO, K.; SPERANDIO, V. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 6, p. 2468–76, 2007.

REN, D.; BEDZYK, L. A.; YE, R. W.; THOMAS, S. M.; WOOD, T. K. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 630–42, 2004.

RENDÓN, M. A.; SALDAÑA, Z.; ERDEM, A. L.; MONTEIRO-NETO, V.; VÁZQUEZ, A.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10637–42, 2007.

- REZZONICO, F.; SMITS, T. H. M.; DUFFY, B. Detection of AI-2 receptors in genomes of enterobacteriaceae suggests a role of type-2 *quorum sensing* in closed ecosystems. **Sensors**, v. 12, n. 5, p. 6645–6665, 2012.
- RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Vet. Res.**, v. 36, n. 2, p. 241–256, 2005.
- ROJAS, T. C. G.; MALUTA, R. P.; PARIZZI, L. P.; KOENIGKAN, L. V.; YANG, J.; YU, J.; PEREIRA, G. A. G.; DIAS DA SILVEIRA, W. Genome sequences of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from brazilian commercial poultry. **Genome Announcements**, v. 1, n. 2, 2013.
- RON, E. Z. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 28–32, 2006.
- ROY, V.; FERNANDES, R.; TSAO, C.-Y.; BENTLEY, W. E. Cross species *quorum quenching* using a native AI-2 processing enzyme. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 223–232, 2009.
- SALTMAN, L. H.; LU, Y.; ZAHARIAS, E. M.; ISBERG, R. R. A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 38, p. 23438–23444, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v. 3
- SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & Development**, v. 15, n. 12, p. 1468–1480, 2001.
- SEO, K. S.; KIM, J. W.; PARK, J. Y.; VIAL, A. K.; MINNICH, S. S. A.; ROHDE, H. N.; SCHNIDER, D. R.; LIM, S. Y.; HONG, J. B.; HINNEBUSCH, B. J.; O'LOUGHLIN, J. L.; DEOBALD, C. F.; BOHACH, G. A.; HOVDE, C. J. Role of a new intimin/invasin-like protein in *Yersinia pestis* virulence. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 10, p. 3559–3569, 2012.
- SHEN, G.; RAJAN, R.; ZHU, J.; BELL, C. E.; PEI, D. Design and synthesis of substrate and intermediate analogue inhibitors of S-Ribosylhomocysteinase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 3003–3011, 2006.
- SHIMIZU, T.; TSUTSUKI, H.; MATSUMOTO, A.; NAKAYA, H.; NODA, M. The nitric oxide reductase of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages. **Molecular Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 492–512, 2012.
- SIRCILI, M. P.; WALTERS, M.; TRABULSI, L. R.; SPERANDIO, V. Modulation of Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by *quorum sensing*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2329–2337, 2004.

SMITH, E. J.; THOMPSON, A. P.; CLARKE, D. J. Pathogenesis of adherent–invasive *Escherichia coli*. **Futur Microbiol.**, v. 8, p. 1289–1300, 2013.

SOJKA, W. J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. **Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux**, 1965. v. 7, p. 231.

SOJKA, W. J.; CARNAGHAN, R. B. A. *Escherichia coli* infection in poultry. **Res. Vet. Sci**, v. 2, p. 340–352, 1961.

SPERANDIO, V.; LI, C. C.; KAPER, J. B. *Quorum-Sensing Escherichia coli* regulator A : a Regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 3085–3093, 2002.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J. B. *Quorum sensing* controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 15196–15201, 1999.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; GIRÓN, J. A.; KAPER, J. B. *Quorum Sensing* is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 17, p. 5187–5197, 2001.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Bacteria–host communication: The language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8951–8956, 2003.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. *Quorum sensing Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by *quorum sensing* in *E. coli*. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 3, p. 809–821, 2002.

STOCK, A M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual review of biochemistry**, v. 69, p. 183–215, 2000.

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. 231–41, 2002.

SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 7046–7050, 1998.

TOTH, T. E.; SIEGEL, P.; VEIT, H. Cellular defense of the avian respiratory system. Influx of phagocytes: elicitation versus activation. **Avian diseases**, v. 31, n. 4, p. 861–7, 1987.

TOUZÉ, T.; HAYWARD, R. D.; ESWARAN, J.; LEONG, J. M.; KORONAKIS, V. Self-association of EPEC intimin mediated by the β -barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 73–87, 2004.

TSAI, J. C.; YEN, M.-R.; CASTILLO, R.; LEYTON, D. L.; HENDERSON, I. R.; SAIER, M. H. The bacterial intimins and invasins: a large and novel family of secreted proteins. **PLoS one**, v. 5, n. 12, p. e14403, jan. 2010.

UBABEF. Relatório Anual. p. 57, 2013.

VENDEVILLE, A.; WINZER, K.; HEURLIER, K.; TANG, C. M.; HARDIE, K. R. Making “sense” of metabolism: Autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 383–396, 2005.

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.

WANG, L.; LI, J.; MARCH, J. C.; VALDES, J. J.; BENTLEY, W. E. *luxS*-dependent gene regulation in *Escherichia coli* K-12 revealed by genomic expression profiling. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 24, p. 8350–8360, 2005.

WANG, Q.; HE, Z.; HU, Y.; JIANG, Y.; MA, R.; TANG, Z.; LIANG, J.; LIU, Z.; HUANG, Z. *luxS* mutant regulation: *Quorum sensing* impairment or methylation disorder? **Sensors**, v. 12, n. 5, p. 6176–6185, 2012.

WANG, S.; NIU, C.; SHI, Z.; XIA, Y.; YAQOOB, M.; DAI, J.; LU, C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 279–287, 2011.

WANG, S.; SHI, Z.; XIA, Y.; LI, H.; KOU, Y.; BAO, Y.; DAI, J.; LU, C. IbeB is involved in the invasion and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3–4, p. 411–419, 2012.

WANG, X.; WANG, Q.; YANG, M.; XIAO, J.; LIU, Q.; WU, H.; ZHANG, Y. QseBC controls flagellar motility, fimbrial hemagglutination and intracellular virulence in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 3, p. 944–53, mar. 2011.

WEISS, D. S.; BROTCHE, A.; HENRY, T.; MARGOLIS, J. J.; CHAN, K.; MONACK, D. M. In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 14, p. 6037–42, 2007.

WIDMER, K. W.; SONI, K. A.; HUME, M. E.; BEIER, R. C.; JESUDHASAN, P.; PILLAI, S. D. Identification of poultry meat-derived fatty acids functioning as *quorum sensing* signal inhibitors to autoinducer-2 (AI-2). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. M363–M368, 2007.

WOOD, T.; GONZÁLEZ BARRIOS, A.; HERZBERG, M.; LEE, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 361–367, 2006.

WOOLEY, A. R. E.; GIBBS, P. S.; BROWN, T. P.; GLISSON, J. R.; STEFFENS, W. L. Note-colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. **Avian Diseases**, v. 42, n. 1, p. 194–198, 1998.

WRAY, C.; WOODWARD, M. J. Laboratory diagnosis of *Escherichia coli* infections. In: GYLES, C. L. (Ed.). **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, 1994. p. 595–628.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. L. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 750–753, 2005.

XU, H.; LING, J.; GAO, Q.; HE, H.; MU, X.; YAN, Z.; GAO, S.; LIU, X. Role of the *lpxM* lipid A biosynthesis pathway gene in pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* strain E058 in a chicken infection model. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 516–26, 2013.

ZAAS, D. W.; DUNCAN, M. J.; LI, G.; WRIGHT, J. R.; ABRAHAM, S. N. *Pseudomonas* invasion of type 1 pneumocytes is dependent on the expression and phosphorylation of Caveolin-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4864–4872, 2005.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 40, 2008.

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 *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 5, p. 1634–44, 2009.

ZHAO, S.; MAURER, J. J.; HUBERT, S.; VILLENA, J. F. DE; MCDERMOTT, P. F.; MENG, J.; AYERS, S.; ENGLISH, L.; WHITE, D. G. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Veterinary microbiology**, v. 107, n. 3-4, p. 215–24, 2005.

ZHUGE, X.; WANG, S.; FAN, H.; PAN, Z.; REN, J.; YI, L.; MENG, Q.; YANG, X.; LU, C.; DAI, J.; AGRICULTURAL, N. Characterization and functional analysis of AatB, a novel autotransporter adhesin and virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.81., n.7, p.2437-3447, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Certificados Comissão de Ética no Uso De Animais (CEUA)



UNICAMP



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.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Aloriso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6139
13385-570 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6388
E-mail: comisb@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceua/>

ANEXO B – Certificados Comissão de Ética no Uso De Animais (CEUA)



Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "CONSTRUÇÃO DE MUTANTES PARA OS GENES *ychO*, *luxS* E *gacC* PRESENTES EM UMA LINHAGEM DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC): ANÁLISES IN VIVO E IN VITRO" (protocolo nº 2669-1(B)), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira / Lívia Pilati Mendes da Silva, 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 11.784, 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.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 18 de fevereiro de 2014.

Campinas, 18 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13063-870 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comsit@unicamp.br
<http://www.la.unicamp.br/ceua/>

