UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIELA THIM VITORINO

ANÁLISE DA AÇÃO DO SISTEMA LISINA DESCARBOXILASE EM UMA LINHAGEM DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC) CAUSADORA DE SÍNDROME DE CABEÇA INCHADA

Campinas

2019

MARIELA THIM VITORINO

ANÁLISE DA AÇÃO DO SISTEMA LISINA DESCARBOXILASE EM UMA LINHAGEM DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA PARA AVES (APEC) CAUSADORA DE SÍNDROME DE CABEÇA INCHADA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na Área de Microbiologia.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARIELA THIM VITORINO E ORIENTADA PELO WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA

Campinas

2019

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

V833a

Vitorino, Mariela Thim, 1990-
Análise da ação do sistema lisina descarboxilase em uma linhagem de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) causadora da sindrome de cabeça inchada / Mariela Thim Vitorino. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

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

1. Análise de mutantes. 2. Operon. 3. *Escherichia coli*. I. Silveira, Wanderley Dias, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analyses of the action of the lisine decarboxylase system in a avian pathogenic *Escherichia coli*(APEC) line causing syndrome
Palavras-chave em inglês:
Mutation analysis
Operons
Escherichia coli
Área de concentração: Microbiologia
Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular
Banca examinadora:
Wanderley Dias da Silveira [Orientador]
Marcelo Brocchi
Marcelo de Carvalho Ramos
Gerson Nakazato
Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Data de defesa: 13-12-2019
Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-1399-3243
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/8720160357892437

Campinas, 13 de dezembro de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Prof. Dr. Gerson Nakazato

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Unidade Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia.

Dedico aos meus avós Ulysses e Amalia por todos ensinamentos, amor, carinho e paciência, ao Liberato e Antonia pelo amor ao meu pai, aos meus pais, Valdemir e Lucinéia, por todo apoio, amor, carinho e por nunca medirem esforços por mim e minhas irmãs, e às minhas irmãs Gabriela, Rafaela e Marcela por todo amor, amizade e companheirismo.

Agradecimentos

Antes e acima de tudo agradeço a Deus por tudo que tem me dado, por estar sempre ao meu lado e por me conceder força e perseverança necessárias para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Wanderley Dias da Silveira pela orientação e oportunidade, pelos ensinamentos, pela amizade, compreensão, por me dar espaço para aprender e crescer profissionalmente junto com seu grupo. Obrigada por tudo professor.

À minha coorientadora Janaína Garbim por todo apoio, amizade, conselhos e ensinamentos.

À todos do laboratório do professor Wanderley pela convivência, ajuda e principalmente, pelos ensinamentos e companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por último, porém mais importante, agradeço a minha família. Meus pais, avó e irmãs, anjos da guarda que Deus me deu, por sempre darem alegria para minha vida. Agradeço todos os dias simplesmente pelo fato de vocês existirem, serem quem são, e fazerem parte de minha vida. Vocês são co-autores dessa conquista. Obrigada por tudo.

RESUMO

Escherichia coli é um bastonete Gram negativo, não esporulado, oxidase negativo, móvel por flagelos peritríquios ou imóvel. Esta bactéria está presente no trato gastrintestinal de seres humanos e de outros animais, constituindo parte da microbiota normal. Existem, porém, linhagens que também são patogênicas. Entre as linhagens patogênicas, aquelas denominadas *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) são responsáveis por vários processos patológicos. De maneira geral, as infecções causadas por APEC são coletivamente denominadas Colibacilose e representam grave ameaça econômica à produção de aves em todos os países por produzirem níveis significativos de mortalidade e morbidade. Embora vários genes e mecanismos genéticos já tenham sido descritos como sendo responsáveis pela patogenicidade e mecanismos de virulência das linhagens APEC, muitos outros ainda podem existir devido à heterogeneidade genética desta população bacteriana. Alguns trabalhos demonstraram que o operon Lisina Descarboxilase (CAD) influencia características de linhagens de *Shigella*, linhagens diarreiogênicas de *E. coli* de origem humana e *Salmonella*, entre outras, mediando um efeito "patoadaptativo" sobre a patogenicidade e outras características biológicas das diferentes linhagens estudadas. Em linhagens APEC, não existem estudos envolvendo o operon CAD (genes *cadA, cadB, cadC*), frente a isso, decidimos estudar genes possivelmente envolvidos com a patogenicidade de uma linhagem APEC causadora de Síndrome da Cabeça Inchada (SCI-07) e verificar seu efeito através de suas características biológicas ou de virulência, em comparação com a linhagem selvagem original e sua linhagem complementada. Os resultados aqui obtidos nos permitiram ver que o gene *cadC* possuí uma grande influência na patogenicidade em aves SCI 07 – APEC, reduzindo, significativamente, a mortalidade em aves de um dia de idade e diminuindo a infecção sistêmica, sendo considerado então, o gene com maior importância do operon *cad*.

ABSTRACT

Escherichia coli is a Gram negative, non-sporulated, negative oxidase, peritoneal flagellate, or immobile rod. This bacterium is present in the gastrointestinal tract of humans and other animals, constituting part of the normal microbiota. There are, however, lineages that are also pathogenic. Among the pathogenic strains, those called avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) are responsible for several pathological processes. In general, infections caused by APEC are collectively termed colibacillosis and pose a serious economic threat to poultry production in all countries because they produce significant levels of mortality and morbidity. Although several genes and genetic mechanisms have already been described as responsible for the pathogenicity and virulence mechanisms of APEC strains, many others may still exist due to the genetic heterogeneity of this bacterial population. Some studies have shown that the Operon Lysine Descarboxylase (CAD) influences characteristics of Shigella strains, diarrheagenic E. coli strains of human origin and Salmonella, among others, mediating a "pathoadaptative" effect on pathogenicity and other biological characteristics of the different studied strains. As in APEC strains, as far as we know, there are no studies involving the CAD operon (*cadA, cadB, cadC* genes), so we decided to study genes possibly involved with the pathogenicity of an APEC strain causing Swollen Head Syndrome (SCI- 07) and verify its effect through its biological or virulence characteristics, compared to the original wild line and its complemented line. The results obtained here allow us to see that the *cadC* gene has a great influence on pathogenicity in SCI 07 - APEC birds, significantly reducing mortality in day-old birds and decreasing systemic infection, being considered, then, the most important gene of operon cad.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Plasmídeo pKD46.....21

Figura 2. Porção do plasmideo pKD3 o qual atua como molde para amplificação do cassete de resistência ao cloranfenicol.....21

Figura 3. Quadro representativo da técnica de deleção por Lambda Red.....23

Figura 4. Mapa do vetor de clonagem pACYC177.....28

Figura 5. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene *cadA* 34

Figura 6. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene *cadB* 35

Figura 7. Eletroforograma em gel de agarose referente ao gene *cadC* 35

Figura 8. Ensaio de invasão das linhagens mutantes em comparação à selvagem em HeLa.....36

Figura 9. Quantificação da adesão à linhagem celular em HeLa.....38

Figura 10. Sobrevivência em macrófagos (linhagem HD11).....39

Figura 11. Sobrevivência em macrófagos (linhagem HD11).....39

Figura 12. Sobrevivência em macrófagos (linhagem HD11).....40

Figura 13. Curva de crescimento.....41

Figura 14. Motilidade do tipo *Swimming*.....42

Figura 15. Ensaio de formação de Biofilme.....44

Figura 16. Mortalidade cumulativa em dias pós-infecção (dpi) de aves infectadas pela via do saco aéreo torácico direito.....45

Figura 17. Teste de infecção sistemica no pulmão 46

Figura 18. Teste de infecção sistemica no baço.....46

Figura 19. Teste de infecção sistemica no fígado.....47

Figura 20. Padrões de expressão de 11 genes identificados nas amostras sequenciadas por RNA-Seq.....49

Figura 21. Níveis de expressão relativa de DEGs de *ΔcadC* pela técnica de qRT-PCR.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados para deleção dos genes no genoma da linhagem SCI-07.....24

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para detecção dos genes alvo de deleção no genoma da linhagem SCI -07.....26

Tabela 3. Sequência dos iniciadores utilizados na construção dos complementos dos mutantes na linhagem SCI- 07.....28

Tabela 4. Transcriptomas através de dados de RNA-seq.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

SCI 07 – Síndrome da Cabeça Inchada

APEC – Escherichia Coli patogênica para aves

°C - Graus Celsius

µL - Microlitro

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

h – Hora

µg – Micrograma

µL – Microlitro

RNA - Ácido ribonucleico

pb - Pares de base

SUMÁRIO

Conteúdo

1. Introdução 14

2. Revisão Bibliográfica 15

***2.1 Escherichia coli* Patogênica para Aves (APEC) 15**

2.2 Justificativa 18

3. Objetivos 19

4. Material e Métodos 20

4.1. Linhagem bacteriana 20

4.2. Deleção gênica mediante utilização da técnica de "Lambda red" 20

4.2.1Obtenção dos plasmídios 20

4.3. Transformação da linhagem SCI-07 com o plasmídio pKD46. 21

4.4. Seleção dos transformantes 22

4.5. Iniciadores 22

4.6. Construção do inserto 23

4.7. Concentração do inserto 24

4.8. Eletroporação do inserto 24

4.9. Seleção dos mutantes 25

4.10. Construção dos complementos dos mutantes 26

4.11. Ensaio de adesão a Fibroblasto de Embrião de Galinha (FEG) 29

4.12. Ensaio de Invasão em células HeLa cultivadas in vitro 29

4.13. Ensaio de Sobrevivência em Macrófago 30

4.14. Curva de Crescimento 31

4.15. Ensaio de motilidade do tipo swimming 31

4.16. Ensaio de Formação de Biofilme 31

4.17. Ensaios *in vivo* 32

4.18. Análise RNA-seq (transcriptoma) 32

4.19. Validação dos resultados do transcriptoma por qRT-PCR 32

5. Resultados 34

5.1. Construção dos mutantes pela técnica de "Lambda Red" e posterior complementação com plasmídio pACYC177. 34

5.2. Invasão em células HeLa 36

5.3. Adesão em células HeLa 36

5.4. Ensaio de sobrevivência em macrófagos de ave 38

5.6. Avaliação da motilidade do tipo "Swimming"..... 41

5.7. Ensaio de formação de biofilme 42

5.8. Avaliação da mortalidade em aves..... 44

5.9. Genes diferencialmente expressos em E. coli entre as linhagens *ΔcadC, C.ΔcadC* e tipo selvagem-SCI-07..... 47

6. DISCUSSÃO..... 51

7. Conclusão 61

8. Referências Bibliográficas..... 62

9. Declaração..... 70

9.1. Declaração de direitos autorais.....71

9.2. Declaração a Bioética e Biossegurança.....72

1. Introdução

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU, 2019), a população mundial em 2050 deve ultrapassar os atuais 6,6 bilhões de habitantes, atingindo aproximadamente 9,2 bilhões. Atualmente, a fome atinge cerca de um bilhão de pessoas, porém segundo estimativas, esse quadro tende a se intensificar nos próximos anos. A carne de frango e ovos são fontes proteicas de alto valor nutricional, baixo custo e importantes geradores de empregos e divisas. O Brasil ocupa a 2ª posição na produção mundial de carne de frango, ficando atrás apenas da China, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor nacional. Além disso, o Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo, seguido pelos Estados Unidos. As exportações de carne de frango brasileiras somaram 323,1 mil toneladas e renderam US$ 551milhões em abril/2019 (ABPA 2019).

O sistema de criação de aves em alta densidade proporciona ao produtor a maximização das instalações, com maior rendimento em termos de quilos de aves por metro quadrado. Com o crescimento da avicultura industrial, muitos patógenos ganharam importância, pois a aglomeração de animais favorece a multiplicação e a disseminação de agentes infecciosos dentro das instalações avícolas.

Diversos agentes virais, fúngicos ou bacterianos causam processos infecciosos em aves, o que pode levar a uma diminuição da produtividade da indústria avícola. Entre os agentes bacterianos, a *Escherichia coli* é um dos patógenos de maior importância. *E. coli* patogênica para aves (APEC – Avian Pathogenic *E. coli*) pode causar vários quadros infecciosos como enterite, artrite, onfalite, coligranuloma, salpingite, septicemia, aerossaculite, entre outros (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). Estes processos são, coletivamente, denominados Colibacilose. Os processos infecciosos acometem aves em todas as idades, porém a susceptibilidade das aves às APEC e a severidade da enfermidade são maiores em aves mais jovens. O processo infeccioso pode ocorrer por transmissão vertical em fêmeas infectadas ou no momento da postura, devido à penetração da bactéria pela casca do ovo, ou ainda, por contaminação fecal no momento do nascimento . A via oral representa a porta de entrada mais importante para aves de um dia de idade. Aves jovens, de quatro a nove semanas de idade, mostram-se mais susceptíveis a quadros respiratórios, e o favorecimento da colonização do trato respiratório superior por APEC ocorre a partir de infecções viral ou bacteriana prévias ou devido à existência de fatores ambientais físicos (poeira, alto conteúdo de amônia na cama aviária) (Andreatti Filho, 2007; Revolledo e Ferreira, 2009).

A descrição de novos mecanismos de patogenicidade presentes nestas linhagens pode contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento da referida área de estudo. Além disso, estes novos conhecimentos podem ajudar a contribuir para a caracterização de linhagens e proteínas alvo para a produção de linhagens vacinais para uso em larga escala nos plantéis aviários.

A linhagem aqui estudada, é denominada SCI-07 (ONT:H31) e foi isolada de uma ave de postura apresentando sinais clínicos de síndrome da cabeça inchada. Para este trabalho, partimos do operon CAD (Lisina Descarboxilase), que exerce um papel "patoadaptativo" em outras linhagens bacterianas patogênicas para o homem e outros animais, onde selecionamos três genes (*cadA, cadB, cadC*) para compararmos a expressão gênicas deles em comparação à essa expressão gênica na linhagem utilizada como padrão deste tipo de ensaio e, ainda, construímos mutantes sítio-dirigidos para estes genes.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Escherichia coli Patogênica para Aves (APEC)

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli, E. blattae, E. fergusonii, E. hermanii, E. vulneris*. Theodor Von Escherich foi o primeiro a descrever este agente, em 1885, denominando-o *Bacterim coli commun.* Em 1958, recebeu a denominação atual, *Escherichia coli* em sua homenagem (Berchieri Junior *et al.*, 2009). *E. coli* é um bastonete curto, Gram-negativo, não esporulado, medindo entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm; a maioria é móvel, devido à existência de flagelos peritríqueos (Barnes*et al*., 2003; Oliveira *et al*., 2004; Quinn *et al*., 2005). Caracteriza-se por apresentar metabolismo anaeróbio facultativo sendo capaz de fermentar, com produção de ácido e gás, a lactose, glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose. A fermentação do adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ornitina, dulcitol e arginina é variável (Quinn*et al.,* 2005; Andreatti Filho, 2007). Kauffmann (1947) classificou os sorotipos de *E. coli* conforme os antígenos somáticos e flagelares que apresentam. O antígeno somático (O) é um polissacarídeo termoestável (121ºC por 2 h) e forma a parte do lipopolissacarídeo presente na membrana externa das bactérias Gram negativas. O antígeno capsular (K) refere-se aos polissacarídeos capsulares que envolvem a bactéria. O antígeno flagelar (H) possui estrutura de natureza proteica e são termolábeis (100ºC por 30 min).

A distribuição dos vários sorotipos de *E. coli* é cosmopolita, habitando o trato entérico

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

A Colibacilose é uma das mais comuns e principais doenças na avicultura industrial moderna (Assis e Santos, 2001; Barcelos, 2005). O aparecimento da Colibacilose é o resultado da interação da bactéria com o hospedeiro e com o meio ambiente, sendo que só amostras patogênicas possuem capacidade de causar a doença. Linhagens de *E. coli* do grupo APEC podem ser encontradas nas fezes e na cama dos aviários e têm sido associadas a infecções extra-intestinais, sendo que o processo infeccioso pode iniciar-se através da casca do ovo ou através do aparelho respiratório. Este último é considerado a principal porta de entrada para o referido patógeno em condições naturais (Assis e Santos, 2001; Barcelos, 2005). A contaminação das aves recém-nascidas com cepas APEC pode ocorrer devido à passagem da bactéria pela casca do ovo, no incubatório ou por via umbilical nos pinteiros. As aves podem nascer contaminadas e apresentar quadros de colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerosaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, doença respiratória crônica complicada (DRCC), onfalite, síndrome de cabeça inchada (SCI), panoftalmia, osteomielite, salpingite, ooforite, artrite, sinovite e perihepatite. Além disso, aves adultas também podem se contaminar, seja por via aérea (principal via de infecção), via trato digestório (nesse caso, linhagens patogênicas podem fazer parte da flora intestinal) ou via ferimentos que ocorrem durante o processo de confinamento. Pela gravidade e alta capacidade de difusão entre hospedeiros essa doença pode causar grande mortalidade (Assis e Santos, 2001; Barcelos, 2005; Campos *et al*., 2005; Matter *et al*., 2011).

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

coronavírus (Morley & Thomson, 1984). A doença tem sido identificada em áreas de intensa produção avícola no mundo todo (Nakazato *et al*., 2009). Em aves poedeiras e reprodutoras, acarreta queda na produção e na qualidade dos ovos causando mortalidade em torno de 1% a 3% e morte embrionária de 3% a 10% (Gross, 1994). Em frangos de corte, onde são observados secreção nasal, depressão e edema subcutâneo, a taxa de mortalidade fica em torno de 1% a 5% podendo alcançar 30% em casos severos (Gaudry, 1994). A patogênese da SCI ainda não está bem elucidada, no entanto, sabe-se que o tecido linfoide associado à conjuntiva, quando da inflamação por infecção viral ou irritação por amônia, permite o acesso da APEC ao tecido subcutâneo (Barnes & Gross, 1997).

Em *E. coli*, os diferentes patotipos, à exceção de APEC, possuem características específicas de patogenicidade (Kaper *et al*., 2004).

Lisina descarboxilase é expressa em *E. coli* e outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* sob condições de baixo pH, na presença de seu substrato específico (lisina). O operon responsável pela descarboxilação da lisina é o operon cad. O operon cad possui três genes, *cadC* (regula a expressão de genes envolvidos na síntese de cadaverina), *cadB* (codifica lisina descarboxilase, indução de cadaverina) e *cadA* (induz lisina descarboxilase). Em linhagens de *Shigella* ssp e *Escherichia coli* diarreiogênicas para humanos, mutações no operon cad levam ao fenótipo "patoadaptativo", o qual pode ser representado por alterações na patogenicidade (*Shigella)* ou alterações em caracteres fenotípicos associados à virulência de *E. coli* diarreiogênicas para humanos. Experimentos iniciados com o trabalho de Maurelli *et al*. (1998) têm demonstrado que a função do *locus cad* não é apenas a degradação da lisina, sendo verificado que os produtos gênicos do mesmo participam na regulação de diferentes funções, incluindo a atividade de fator de "antivirulência" em alguns patógenos, responsáveis por infecções entéricas em humanos e que a sua ausência, por mutação, criaria a chamada mutação patoadaptativa (modificações genéticas que aumentam a "performance" do patógeno em um novo ambiente associado ao hospedeiro). Maurelli *et al*. (1998) demonstraram que a introdução do gene *cadA* em *Shigella flexneri* (LDC^-) causou a atenuação da virulência, diminuição da produção de enterotoxina e diminuição de sua capacidade invasiva, principalmente devido ao bloqueio da capacidade deste organismo em estimular a migração transepitelial de leucócitos polimorfonucleares (LPMN), com consequente alteração da resposta inflamatória e posterior diminuição da interação deste patógeno com o citoesqueleto celular. Estudos posteriores (Day *et al*., 2001) demonstraram que o fenótipo LDC^- era devido a uma grande deleção, de aproximadamente 90Kb, no cromossomo de *S. flexneri*, próxima ao

gene *cadA*. Deleções semelhantes, em maior ou menor extensão, também foram localizadas em outras enterobactérias LDC$^-$, incluindo EIEC e STEC (*E.coli* produtora de toxina Shiga*)* (Torres *et al*., 2009), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (Jores *et al*., 2006). De maneira geral, verificou-se que este operon influencia positivamente o aumento da adesão em STEC O157:H7 (Torres and Kaper, 2003) e aumenta a competição desta amostra em condições *in vivo* (Ritchie and Waldor, 2005), influencia negativamente a adesão de algumas outras linhagens de *E. coli* diarreogênicas (O111:NM, O111:H8, O26:NM), estimula a produção de poliaminas, que protege *E. coli* uropatogênica (UPEC) contra os efeitos deletérios dos radicais tóxicos do nitrogênio produzidos pelas células hospedeiras, protege *Salmonella* e *E. coli* contra condições ácidas (Moreau, 2007); estimula o sistema GadABC (glutamato dependente) em células de *E. coli* em condições de estresse alimentar (Moreau, 2007), contribuiria para a sobrevivência de *Salmonella Typhimurium*em em tecidos específicos do hospedeiro (Heithoff *et al.*, 1997) e contribui positivamente para a tolerância ao ácido em *Vibrio vulnificus* (Rhee *et al*., 2002; Rhee *et al*., 2005).

Em resumo, as mutações no operon *cad* parecem produzir um efeito "patoadaptativo" em diferentes patógenos bacterianos, influenciando, positivamente ou negativamente, a expressão de certos genes, ou grupos de genes, alterando de maneira significativa a relação patógeno-hospedeiro e, por extensão, a patogenicidade e a virulência.

2.2 Justificativa

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

3. Objetivos

Demonstrar o papel que o operon *cad* (lisina descarboxilase) possui em relação a patogenicidade de uma linhagem APEC causadora de SCI em aves, deletando individualmente os genes *cadA*, *cadB* e *cadC*.

3.1. Objetivos específicos

- Construir mutantes nulos em genes específicos.
- Avaliar nos mutantes nulos características que incluam: capacidade de adesão e invasão de linhagens celulares cultivadas *in vitro*, viabilidade intracelular em macrófagos e ensaios de formação de biofilme, análises por RNAseq e RT-PCR.
- Analisar o potencial patogênico dos mutantes nulos em aves de um dia de idade, através da comparação da mortalidade e grau de lesão do grupo de aves desafiado com cultura das linhagens mutantes em comparação à linhagem selvagem.

4. Material e Métodos

4.1. Linhagem bacteriana

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

4.2. Deleção gênica mediante utilização da técnica de "Lambda red"

4.2.1. Obtenção dos plasmídios

O plasmídio pkD46 (Figura 1) hospedado em *E. coli* linhagem DH10β e o plasmídio pKD3 (Figura 2) hospedado em *E. coli* linhagem S17λpir foram extraídos utilizando-se o Kit Qiagen Mini Prep Spin (Qiagen nº catalogo 27106). Culturas de DH10β pKD46 foram preparadas em 10mL de caldo LB contendo 100µg/mL de Ampicilina e incubados durante à noite a 29°C. A cultura total foi centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos, o sedimento obtido foi submetido ao Kit Quiagen mini prep de acordo com as recomendações do fabricante. Para o plasmídio pKD3 a cultura de S17pKD3 foi preparada em 4mL de caldo LB acrescido de 20µg/mL de Cloranfenicol. A cultura foi incubada a 37ºC durante a noite, posteriormente 1 mL da cultura foi centrifugado, como descrito anteriormente e submetido ao Kit miniprep.

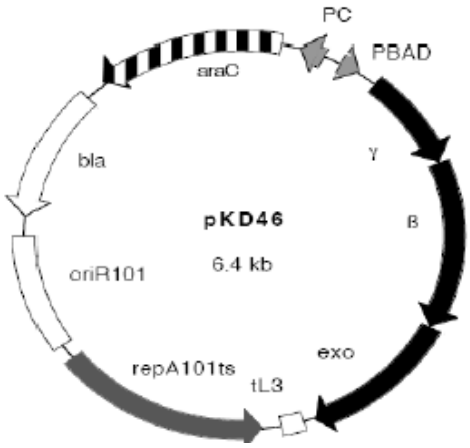


Figura 1. Mapa do Plasmídio pKD46 o qual carrega o sistema de recombinação denominado "Lambda red" representado pelas proteínas beta, gama e exo sob o controle do promotor de arabinose (pBAD) (Datsenko & Wanner, 2000).

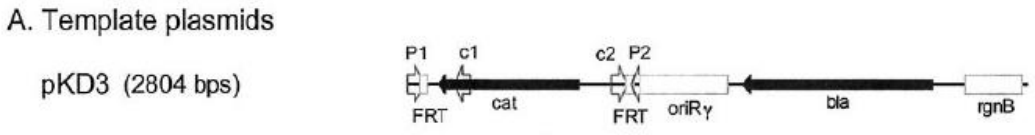


Figura 2. Porção do plasmídio pKD3 o qual atua como molde para amplificação do cassete de resistência ao cloranfenicol (cat), as regiões P1 e P2 referem-se às sequências nas quais os iniciadores se anelam para a amplificação do inserto (Datsenko & Wanner, 2000).

4.3. Transformação da linhagem SCI-07 com o plasmídio pKD46.

Uma cultura de 4 mL da linhagem SCI07 foi preparada em meio de cultura LB contendo os antibióticos Tetraciclina (40 µg/mL), Estreptomicina (100 µg/mL) e Gentamicina (10 µg/mL) e incubada a 37°C durante à noite. Desta cultura, foi inoculado 1 mL em 100 mL de caldo LB mantido à temperatura ambiente com posterior incubação a 29°C em agitação (150 rpm) até a obtenção da OD_{600} 0,5 (2 horas e 30 min, aproximadamente). Esta cultura foi resfriada em gelo por 30 minutos. A cultura foi, então, centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4ºC, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado três vezes em solução gelada de glicerol 10% (4000 rpm por 15 minutos a 4ºC). Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspendido em 100 µL de água gelada, misturado a 15 µL do plasmídio pKD46 e depositado em cubeta de 0,2 cm para eletroporação. A amostra foi submetida ao eletroporador BioRad calibrado com 2,5 Kv de voltagem, 200 Ohms de resistência e 25 µFD de capacitância. Após o pulso elétrico, foi

acrescentado, imediatamente, dentro da cubeta de eletroporação, 1,5 mL de caldo SOC e a bactéria foi, então, incubada a 29°C durante à noite. Decorrido este período, a cultura foi centrifugada a 12000 g por 2 minutos, o precipitado ressuspendido em 100 µL de PBS pH 7,4 e plaqueado em Agar LB contendo 100 µg/mL de Ampicilina (LB Amp). As placas foram incubadas a 29°C por 24 horas.

4.4. Seleção dos transformantes

Colônias emergentes nas placas de Àgar LB Amp foram inoculadas em caldo LB contendo os antibióticos Ampicilina (100 µg/mL), Tetraciclina (40 µg/mL) e Gentamicina (10 µg/mL), as culturas foram incubadas a 29°C/24h. A presença do plasmídio pkD46 foi confirmada através da extração de plasmídeos e verificação em gel de agarose 0,8% após eletroforese. Colônias da linhagem SCI-07 positivas foram acrescidas de Glicerol (30% concentração final) e estocadas (-80ºC).

4.5. Iniciadores

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

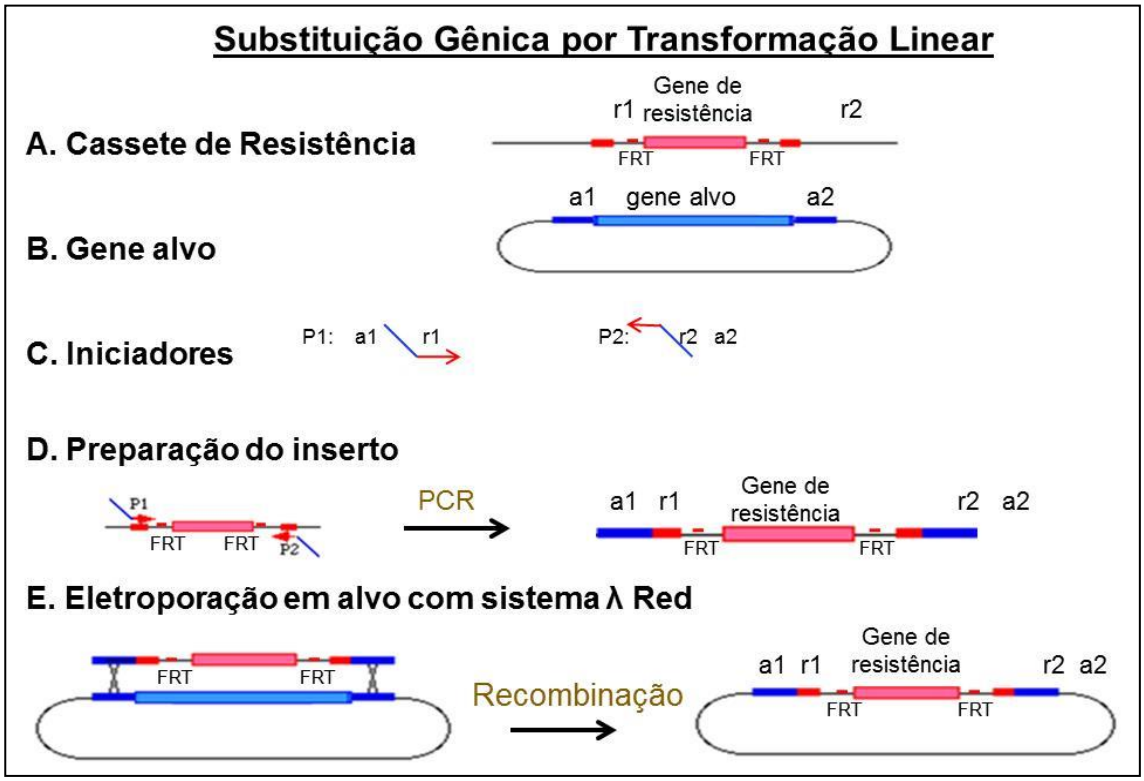


Figura 3. Quadro representativo da técnica de deleção por Lambda Red. (A) Representação do plasmídio pKD3. (B) Representação do gene alvo de deleção no cromossomo da linhagem SCI-07 flanqueado pelas sequências de 50pb (a1 e a2) alvos da recombinação. (C) Representação dos oligonucleotídeos de 70 pares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

4.6. Construção do inserto

A reação de PCR para construção do inserto foi composta de 5µL de Tampão Pfx 10X; 38,1 µL de água ultra-pura; 1,5 µL de DNTP mix (10mM cada); 0,4µL Platinum Pfx DNA polimerase; 1 µL de $MgSO_4$ (50mM); 1,5 µL de cada iniciador (Tabela 1) (10µM) e 1,0 µL da solução de pKD3. Para cada gene, foram preparados 200µL totais de reação de PCR. O termociclador foi programado com 1° estágio de 94°C/5min (1ciclo), 2° estágio de 94°C/15seg, 55°C/30seg, 68°C/1min (30 ciclos) e 3° estágio de 68°C/10mim (1 ciclo). Os amplicons foram

submetidos ao gel de agarose a 1% sobre campo elétrico de 100 V. O gel foi corado em solução de Brometo de Etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a deleção dos genes *cadA, cadB* e *cadC*. Em amarelo, região homóloga ao gene. Em verde, região homóloga ao gene de resistência ao cloranfenicol.

Gene cadA cadA Del F (Forward) CTTATGAGCAAAAAAGGGAAGTGGCAAGCCACTTCCCTTGTACGAGCTAAGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC CadA Del R(Reverse) CATTTTGTCCCATGTGTTGGGAGGGGCCTTTTTTACCTGGAGATATGACTCATAT GAATATCCTCCTTAG
Gene cadB cadB Del F(Forward) CCCAACACATGGGACAAAATGAAAGGAGGAGCCTCGGAAAATACTTTTAAGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC CadB Del R(Reverse) ATACATCATGACCCGGACTCCAAATTCAAAAATGAAATTAGGAGAAGAGCCAT ATGAATATCCTCCTTAG
Gene cadC cadC Del F (Forward) CAAAAACTCAACAACAAATATTCCCGAGCATGAATCAACCCGGGAGTTACGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC CadC Del R(Reverse) GGTTATGGCAATTATCATTGCATCATTCCCTTTTCGAATGAGTTTCTATTCATAT GAATATCCTCCTTAG

4.7. Concentração do inserto

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

4.8. Eletroporação do inserto

Uma cultura de SCI-07 carregando o plasmídeo pKD46 foi preparada em caldo LB contendo 100 µg de Ampicilina e incubada a 29°C durante à noite. Desta cultura, 500 µL foram transferidos para 20mL de caldo LB fresco acrescido de 10µL de Ampicilina a 50 mg/mL e 5

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

4.9. Seleção dos mutantes

Colônias SCI-07 resistentes ao antibiótico Cloranfenicol (Cm^r) foram novamente plaqueadas em Ágar de MacConkey contendo 10 µg/mL de Cloranfenicol e incubadas a 37°C por 24h e, novamente plaqueadas em ágar LB e testadas por PCR para confirmação da recombinação homóloga entre o cassete de resistência ao antibiótico e o gene alvo. A reação de PCR foi realizada da seguinte forma: 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 $MgCl_2$ (25 mM); 0,5 µL de cada iniciador (Tabela 2) (10µM) e 1 colônia. O termociclador foi programado com 1° estágio de 95°C/3min (1ciclo), 2° estágio de 95°C/20seg, 55-60°C/1mim, 72°C/30 seg a 2 min (25 ciclos) e 3° estágio de 72°C/5mim (1 ciclo). Os amplicons foram submetidos ao gel de agarose a 1% sobre campo elétrico de 100V. O gel foi corado em solução de Brometo de Etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta.

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

Gene *cadA*
***CadA* inside F** (Forward) TTATTTTTTGCTTTCTTCTT ***CadA* inside R** (Reverse) ATGAACGTTATTGCAATATT ***CadA* outside F** (Forward) ACTTCCCTTGTACGAGCTAA ***CadA* outside R** (Reverse) TTTTACCTGGAGATATGACT
Gene *cadB*
***CadB* inside F** (Forward) TTAATGTGCGTTAGACGCTG ***CadB* inside R** (Reverse) ATGAGTTCTGCCAAGAAGAT ***CadB* outside F** (Forward) GCCTCGGAAAATACTTTTAA ***CadB* outside R** (Reverse) AATGAAATTAGGAGAAGAGC
Gene *cadC*
***CadC* inside F** (Forward) TTATTCTGAAGCGAGAAATT ***CadC* inside R** (Reverse) ATGCAACAACCTGTAGTTCG ***CadC* outside F** (Forward) TGAATCAACCCGGGAGTTAC ***CadC* outside R** (Reverse) TTTTCGAATGAGTTTCTATT

4.10. Construção dos complementos dos mutantes

Os complementos dos mutantes foram construídos no vetor de clonagem pACYC177. Os genes originais com seus promotores, amplificados e clonados a partir do DNA genômico da linhagem SCI-07, foram inseridos neste plasmídio entre os sítios das enzimas BamHI e HindIII, dos quais foi aproveitado o promotor da Kanamicina do vetor para expressão do gene

complementado. Ao iniciador de clonagem direto foi acrescentado a sequência de nucleotídeos para restrição pela enzima *XhoI* ou *DraIII* e ao iniciador reverso a sequência de nucleotídeos para corte pela enzima *HindIII* ou *SmaI.* O produto da PCR foi purificado pelo Kit PureLink PCR Purification (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante. O plasmídio pACYC177 foi extraído da linhagem hospedeira como descrito anteriormente para o plasmídio PKD3.

Após a purificação, os fragmentos amplificados e o vetor plasmidial pACYC177 foram duplamente digeridos pelas enzimas de restrição de acordo com as combinações descritas acima, seguindo a seguinte reação: 1,5 µL de cada enzima; 20µL de DNA; 5µL de Red Buffer Fermentas e 22 µL de água. Os 50 µL finais de reação foram incubados a 37ºC por 2 horas. Após a digestão, o vetor foi submetido à eletroforese e purificado do gel de agarose pelo kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen). Os insertos foram purificados pelo Kit PureLink PCR Purification (Invitrogen). Em seguida, a reação de ligação foi feita pela enzima T4 DNA ligase (Fermentas), através da seguinte reação: 5 µL do plasmídio digerido; 5 µL do inserto digerido; 1µL de ligase; 2 µL de 10X buffer Ligase e 7 µL de água, os 20 µL finais de reação foram incubados a 22ºC por 16 horas. A seguir, os plasmídios ligados foram purificados pelo Kit PureLink PCR Purification (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante e eletroporados em *E. coli* K12 linhagem DH10β para a etapa de clonagem e multiplicação sendo posteriormente extraídos e eletroporados nas bactérias mutantes, as quais foram selecionadas, assim, com a linhagem DH10β em placa de Ágar LB, suplementadas com antibiótico Ampicilina (100 µg/mL). Para a confirmação da complementação foram realizadas reações de PCR.

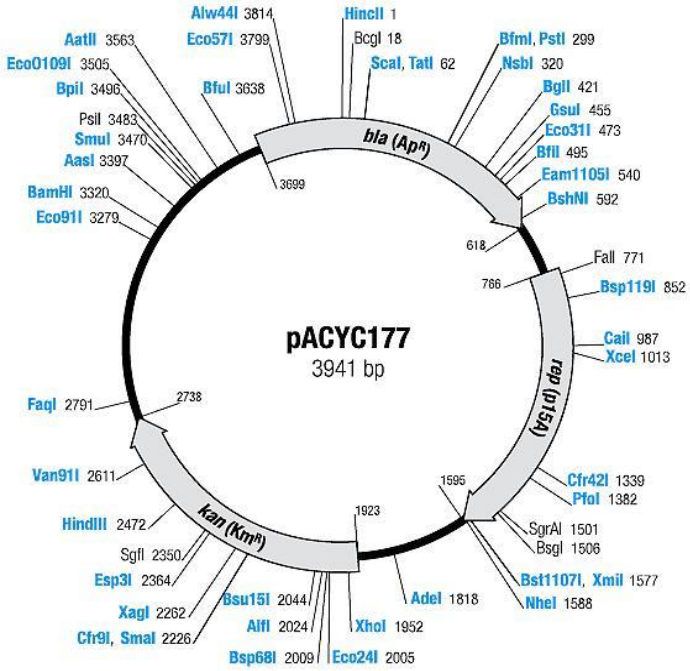


Figura 4. Mapa do vetor de clonagem pACYC177 utilizado para construção dos complementos (Fonte: New England Biolabs)

Tabela 3. Sequência dos primers usados na construção de complementos mutantes na linhagem SCI-07. As sequências amarelas referem-se ao local das enzimas HindIII ou BamHI.

Gene *cadA*
cadA (Forward)
TATTAAGCTTATGAACGTTATTGCAATATT
cadA (Reverse)
TATTGGATCCTTATTTTTTGCTTTCTTCTT
Gene *cadB*
cadB (Forward)
TATTAAGCTTATGAGTTCTGCCAAGAAGAT
cadB (Reverse)
TATTGGATCCTTAATGTGCGTTAGACGCTG
Gene *cadC*
cadC (Forward)
TATTAAGCTTATGCAACAACCTGTAGTTCG
cadC (Reverse)
TATTGGATCCTTATTCTGAAGCGAGAAATT

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

Os mutantes obtidos e a linhagem selvagem foram avaliados quanto às suas habilidades de adesão às células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) na presença e na ausência de um análogo da manose, methyl-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 tetrazoliumdye MTT à formazana (Zaas *et al.*, 2005) e pela determinação do número de bactérias viáveis aderidas à superfície das células pré-fixadas. As células foram crescidas em placa de 96 poços por 18 h em DMEM 10% soro fetal bovino até atingir a confluência. As células foram fixadas gradativamente com solução de paraformoldeído 0,75%, 1,15% e 1,5%, com 30 min de incubação em cada solução. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS pH7,4 esterilizado e, em seguida, bloqueados utilizando 100µL de DMEM BSA 2%, por 1 hora. O inóculo bacteriano foi crescido em meio LB por 18 horas a 37ºC, 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 37ºC em 5% CO_2. O meio foi, então, descartado, os poços lavados 3 vezes com PBS pH 7,4 e 100µl de meio LB adicionados para incubação por 3 horas a 37ºC em 5% CO_2. 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 37ºC em 5% CO_2. O MTT foi removido e foi acrescentado 100 µl da solução de extração Álcool isopropílico e HCl 1N (24:1). A absorbância foi lida a 570nm. 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.

4.12. Ensaio de Invasão em células HeLa cultivadas in vitro

Os mutantes obtidos e a linhagem selvagem foram avaliados quanto às suas habilidades de invasão em células humanas (HeLa). O tipo celular foi crescido por 48 h em DMEM em placa de 24 poços. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS pH7,4 e esterilizado (37°C). A infecção foi realizada em DMEM com 10% soro fetal bovino, foi adicionado 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 CO_2. O meio foi 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 antibiótico foi adicionado aos

poços e a placa incubada por 1 h a 37°C em 5% de CO_2. Após a incubação, as células foram lisadas e plaqueadas para contagem de bactérias. A suspensão obtida foi diluída (em diluições seriadas 1:10) e plaqueadas em meio Ágar de MacConkey. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL foi determinado e transformado em Log_{10}. 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.

4.13. 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 x 10^4 células/cm^2 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 e esterilizado (37°C). A infecção foi realizada em meio de infecção, onde foram adicionadas as linhagens, em multiplicidade de infecção (MOI) de 150 UFC por célula. A incubação ocorreu por 1 hora a 37°C, em 5% de CO_2. O meio foi descartado e os poços lavados 2 vezes com PBS pH7,4. Em seguida, 1 ml de meio de infecção contendo 50 μg/ml de Kanamicina apropriadas para cultivo celular (Sigma) foi adicionado aos poços e a placa incubada por 1 h a 37°C em 5% de CO_2. Após a incubação, o meio foi descartado e os poços lavados 2 vezes com PBS pH7,4. O meio de infecção foi, novamente, adicionado (1 ml), no entanto, dessa vez contendo 10μg/mL dos referidos antibióticos, seguido de incubação por 3 e 18 horas a 37°C em 5% de CO_2. O meio foi descartado e os poços lavados mais uma vez com a placa sendo incubada com Triton X-100 1% por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a suspensão obtida foi diluída (em diluições seriadas 1:10) e plaqueadas em meio Ágar de MacConkey. O número de UFC por mL foi determinado e transformado em Log_{10}. 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.

4.14. Curva de Crescimento

Culturas crescidas durante a noite, em meio LB, foram ajustadas para a mesma densidade com base na OD_{600}, diluídas na proporção 1:100 e cultivadas em DMEM e em LB a 37ºC com agitação de 150 rpm. A OD_{600} foi medida a cada 0,5 h até que a cultura atingisse a fase estacionária.

4.15. Ensaio de motilidade do tipo swimming

Para este 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 umidecido em cultura da linhagem SCI-07, das linhagens mutantes e das complementadas, preparadas em caldo LB. As placas foram incubadas a 37º por 16 h e após esse intervalo, a aferição dos halos de motilidade foi feita. 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).

4.16. Ensaio de Formação de Biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado como descrito por Christensen *et al*., (1985), com algumas alterações. 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 37ºC (estufa de CO_2 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 com 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 foi iniciado 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).

4.17. Ensaios *in vivo*

Para a determinação da patogenicidade das linhagens mutantes, foi feita a avaliação da mortalidade, onde as aves de corte com um dia de vida, não vacinadas no incubatório, foram inoculadas pela via do saco aéreo. Grupos de 20 aves receberam 0,1 mL dos inóculos contendo 10^9 UFC/mL. Os inóculos foram construídos de 10 mL de cultura das linhagens mutantes, de seus complementos ou da linhagem selvagem, preparadas em caldo LB e incubadas a 37°C por 18 horas em agitação (150 rpm). As culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuspendido em 10 mL de PBS pH 7,4. Volumes de 0,1mL do lavado bacteriano foram injetados diretamente no saco aéreo torácico direito, com o auxílio de uma seringa de insulina. As aves foram observadas a cada 12 horas contabilizando-se a mortalidade até sete dias após a inoculação. Ao fim do período de observação, os sobreviventes foram sacrificados, procedendo-se à necropsia e avaliação das lesões. A taxa de mortalidade média das aves foi comparada pelo teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 5% , no software SAS – Statistical Analysis Software

4.18. Análise RNA-seq (transcriptoma)

As células bacterianas foram crescidas em meio LB a 37° C durante a noite e, em seguida, o RNA foi extraído pelo Kit de Purificação de RNA (Thermo Fisher Scientific) com o uso de amostras de alta qualidade que possuíam RIN> 7 (RNA Integrity Number). As bibliotecas foram preparadas usando IlluminaTruSeqStranded mRNA (seleção polyA) e a qualidade verificada pelo Quant-iT (DNA BR) e CaliperGX. O RNA-Seq foi realizado em Illumina HiSeq2500 (leituras de pares de 2×101 bases). As leituras de sequenciamento foram mapeadas utilizando-se como padrão o genoma de *E. coli* SCI-07 ASM25280v2 com anotações de genes de RefSeq (AccessionGCF_000252805.1) utilizando Bowtie2 end-to-end (modo muito sensível) (versão 2.3.3). As contagens de genes e os valores de FPKM foram estimados pelo pacote de Rsubread para R (versão 3.5) e normalizados usando edgeR (versão 3.18.1).

4.19. Validação dos resultados do transcriptoma por qRT-PCR

Os experimentos de RNAseq permitem que se avalie, de uma maneira global, a expressão gênica de um dado organismo, em determinadas condições, usando-se como referência outros organismos já conhecidos. Estes resultados porém, precisam ser validados. Esta validação, em

nosso experimento ocorreu através da reação de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os iniciadores para os experimentos de qRT-PCR, para os genes determinados por RNAseq, foram construídos pelo programa Primer Express Software Version 3.0 (Applied Biosystems®, EUA). 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 48ºC 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 60ºC. 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-se os níveis de expressão do gene *rpoA* (subunidade A da RNA polimerase) e analisados utilizando o método comparative critical threshold (CT) (Walters, Sircili e Sperandio, 2006). A coleção de dados foi analisada utilizando-se o programa StepOne Software v.2.1 (Applied Biosystems®, EUA).

5. Resultados

5.1. Construção dos mutantes pela técnica de "Lambda Red" e posterior complementação com plasmídio pACYC177.

As figuras a seguir apresentam a confirmação da construção dos três mutantes nulos (Δ*cad*A, Δ*cad*B e Δ*cad*C), no genoma da SCI-07 (Figuras de 5 a 7 A) bem como a construção dos nove complementos dos mutantes no plasmídio pACYC177 (Figuras de 5 a 7)

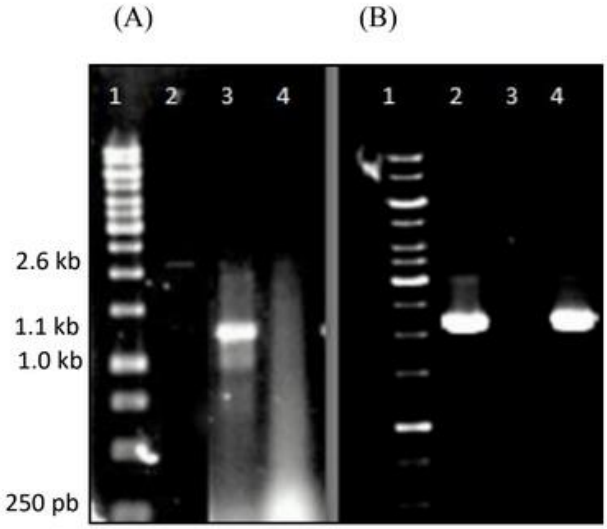


Figura 5: Eletroforograma em gel de agarose (1%) demonstrando a confirmação do mutante e complemento. (A) coluna 1: marcador de peso molecular de 1 kb; coluna 2: DNA SCI-07; coluna 3: amplificação do mutante Δ*cad*A; coluna 4: não amplificação do gene *cadA* em linhagem mutante utilizando iniciadores internos. (B) coluna 1: marcador de peso molecular de 1 kb; coluna 2: o gene *cadA* como controle; coluna 3: não amplificação do gene *cadA* na linhagem mutante; coluna 4: gene *cadA* amplificado na linhagem complementada (C.Δ*cadA*).

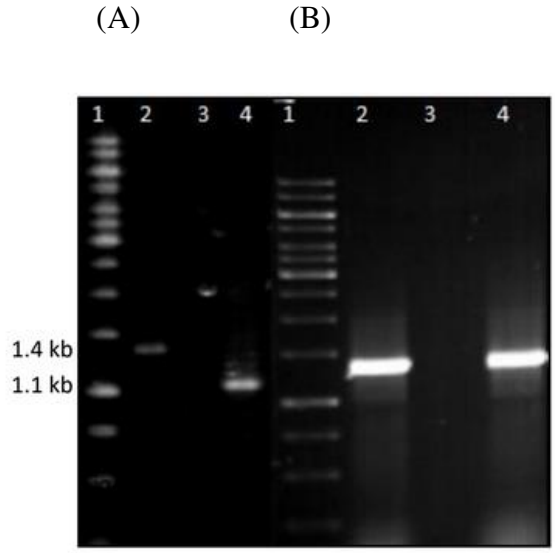


Figura 6: Eletroforograma em gel de agarose (1%) demonstrando a confirmação do mutante e complemento - (A) coluna 1: marcador de escala de DNA de 1 kb; coluna 2: DNA SCI-07 como controle; coluna 3: não amplificação do gene cadB em linhagem mutante utilizando iniciadores internos; coluna 4: amplificação do mutante Δ*cad*B. (B) coluna 1: marcador molecular de escala de 1 kb; coluna 2: o gene *cadB* como controle; coluna 3: não amplicão do gene cadB na linhagem mutante; coluna 4: gene *cadB* amplificado na linhagem complementada (C.Δ*cadB*).

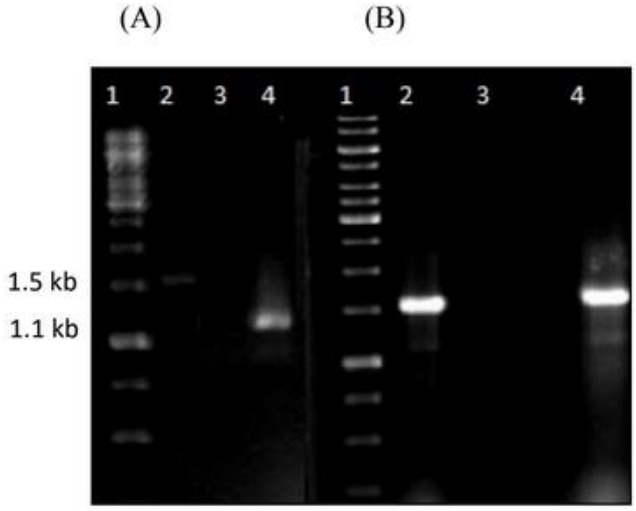


Figura 7: Eletroforograma em gel de agarose (1%) demonstrando a confirmação do mutante e complemento - (A) coluna 1: marcador de escala de DNA de 1 kb; coluna 2: DNA SCI-07 como controle; coluna 3: não amplificação do gene cadC em linhagem mutante utilizando iniciadores internos; coluna 4: amplificação do mutante Δ*cad*C. (B) coluna 1: marcador molecular de escala de 1 kb; coluna 2: o gene *cadC* como controle; coluna 3: não amplicão do gene cadC na linhagem mutante; coluna 4: gene *cadC* amplificado na linhagem complementada (C.Δ*cadC*).

5.2. Invasão em células HeLa

A deleção dos genes *cadA*, *cadB* e *cadC* não aumentou a capacidade da linhagem APEC de invadir células HeLa. Esta capacidade foi testada para melhor compreensão de sua patogenicidade e se o operon cad desempenha um papel fundamental na virulência da linhagem. SCI-07 foi capaz de invadir células HeLa eficientemente (Figura 8). Curiosamente, podemos observar que os mutantes e seus complementos não obtiveram uma maior capacidade de invadir as células de cultura humana do que a linhagem selvagem e foi possível observar que estes resultados não foram estatisticamente significantes (p-valor <0,05).

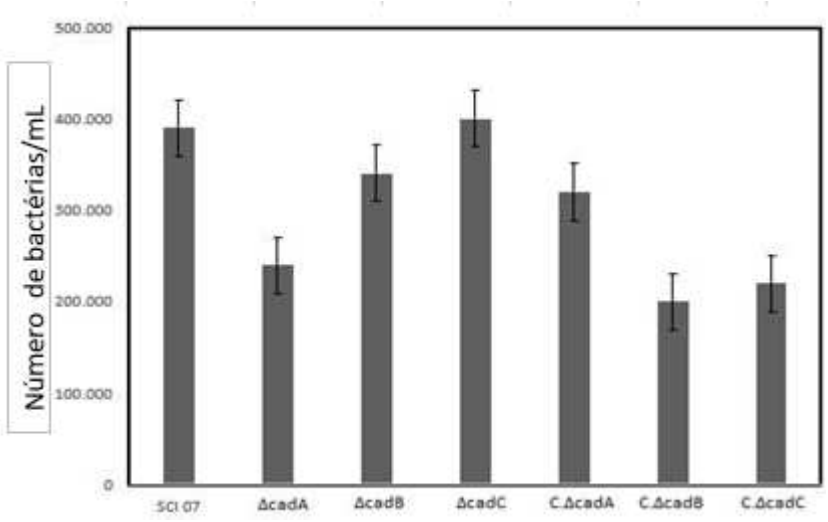


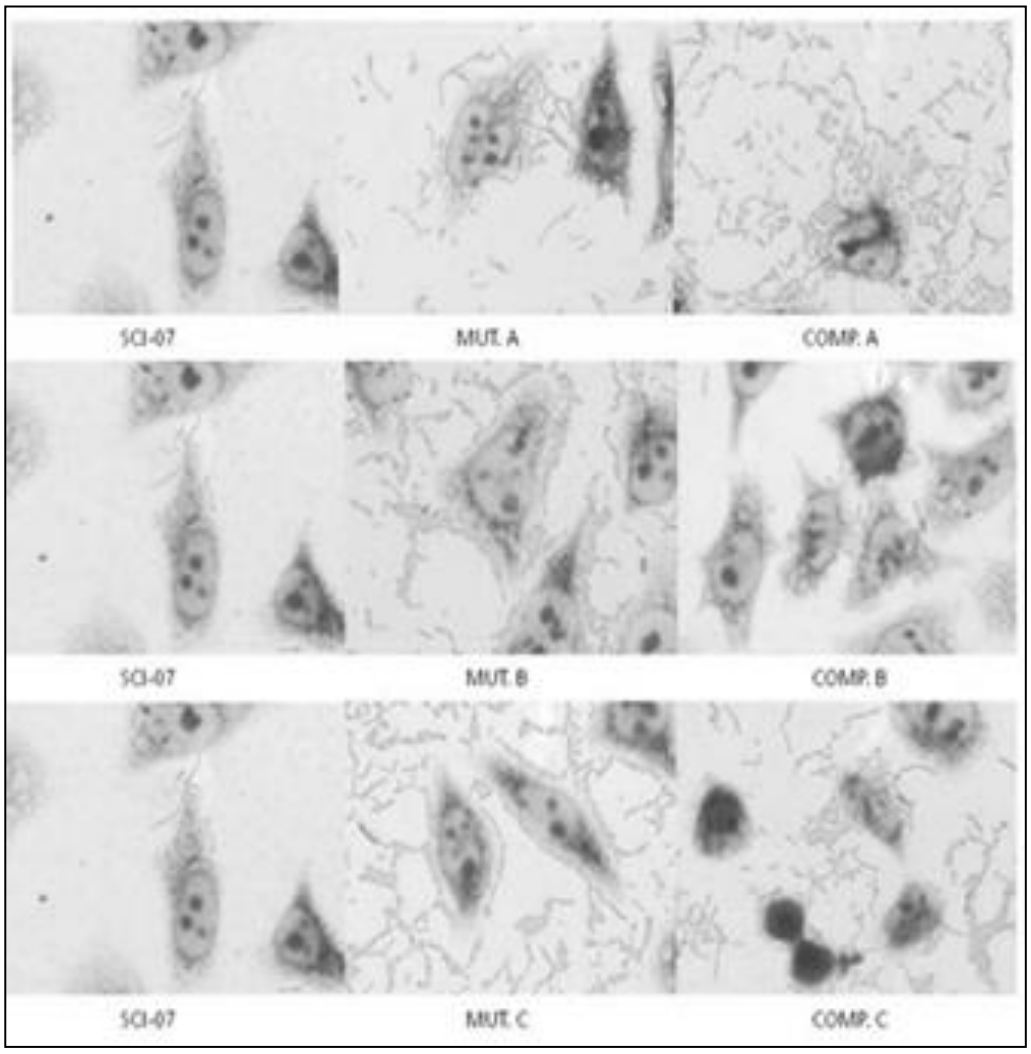
Figura 8. Ensaio de Invasão em para SCI07, Δ*cadA*, Δ*cadB*, Δ*cadC*, C.Δ*cadA*, C.Δ*cadB* e C.Δ*cadC*.

5.3. Adesão em células HeLa

Todos os mutantes de APEC SCI-07 foram submetidos ao ensaio de adesão. Curiosamente, *ΔcadB* e *ΔcadC* mostraram ser altamente aderentes em células HeLa em comparação com *ΔcadA* e a linhagem de tipo selvagem. Contudo, apenas a linhagem *C.cadB* não manteve este padrão de aderência em comparação com as outras linhagens complementares, sugerindo que o gene *cadB* é significativamente importante na adesão bacteriana. A fímbria tipo I também parece ser muito importante na patogenicidade da APEC SCI-07. O teste de adesão usando análogo de D-manose mostrou que a adesão foi completamente inibida em todos os casos, sugerindo que as mutações dos 3 genes não

influenciaram a aderência nas células HeLa, então o papel da fímbria tipo I no processo inicial de adesão parece ser essencial.

(A)



(B)

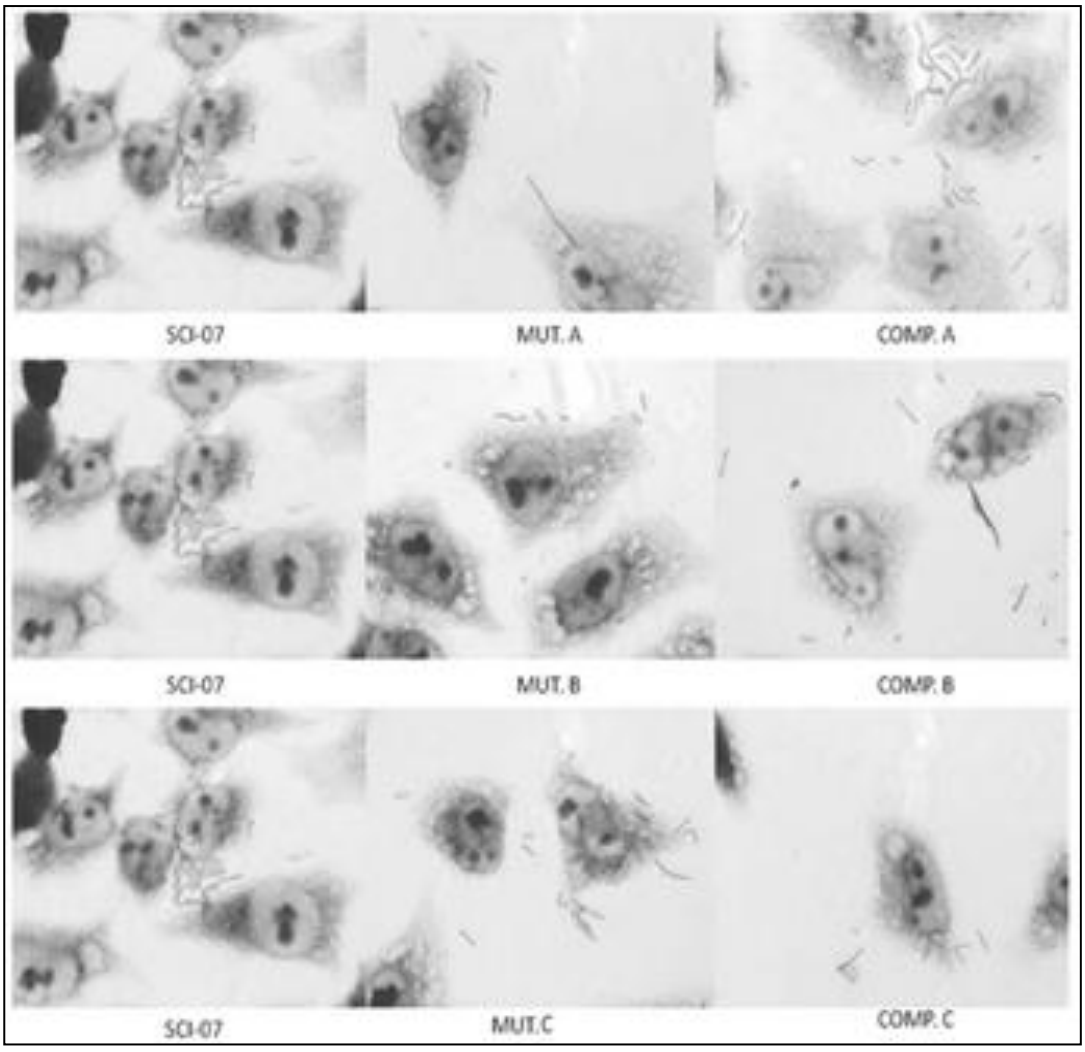


Figura 9: (A) Ensaios de adesão em células HeLa na ausência de análogo de D-manose. (B) Ensaios de adesão em células HeLa na presença de análogo de D-manose.

5.4. Ensaio de sobrevivência em macrófagos de ave

Os resultados obtidos no teste de sobrevivência de linhagens bacterianas em linhagem de macrófago de origem aviária (HD-11) cultivadas *in vitro* demonstraram uma diminuição da capacidade de sobrevivência das linhagens mutantes *cadA* e *cadC* no período de 03 horas de infecção, com recuperação total no período de 18 horas para a linhagem mutante *cadA* e recuperação parcial para a linhagem mutante *cadC.* A linhagem mutante *cadB* apresentou redução da sobrevivência no período de 03 horas, não havendo recuperação no período de 18 horas.

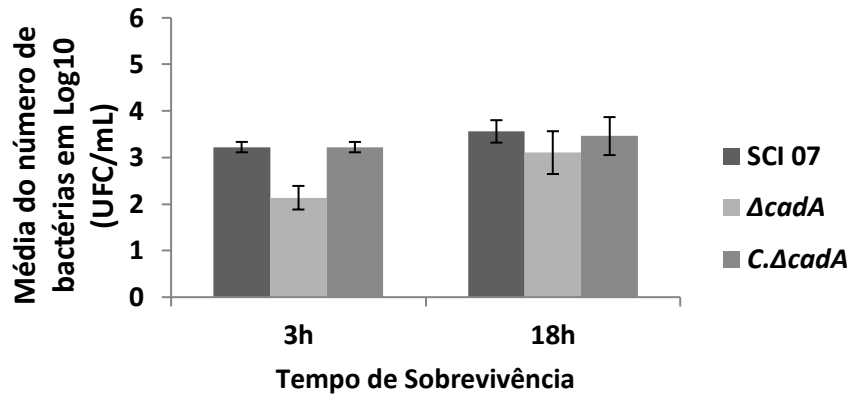


Figura 10. Sobrevivência bacteriana em células de macrófagos aviários (HD11) infectadas com o tipo selvagem (SCI-07), mutante (Δ*cadA*) e complementado (C.Δ*cadA*). Os macrófagos infectados foram lisados às 3 ou 18 horas após a infecção. O desvio padrão foi calculado de acordo com os resultados obtidos. Nenhuma das amostras foi estatisticamente significante em p <0,05. (Software SAS – Statistical Analysis Software).

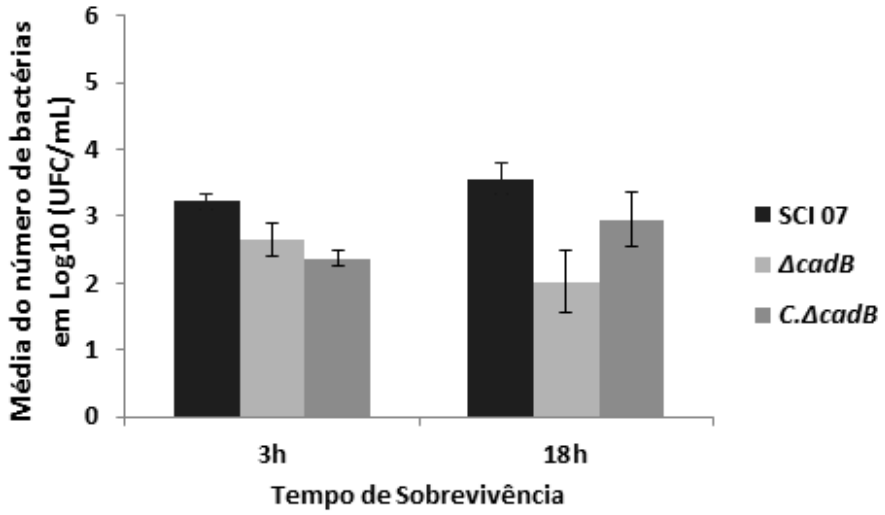


Figura 11. Sobrevivência bacteriana em células de macrófagos aviários (HD11) infectadas com o tipo selvagem (SCI-07), mutante (Δ*cadB*) e complementados (*C.*Δ*cadB*). Os macrófagos infectados foram lisados às 3 ou 18 horas após a infecção. O desvio padrão foi calculado de acordo com os resultados obtidos. Nenhuma das amostras foi estatisticamente significante em p <0,05. (Software SAS – Statistical Analysis Software).

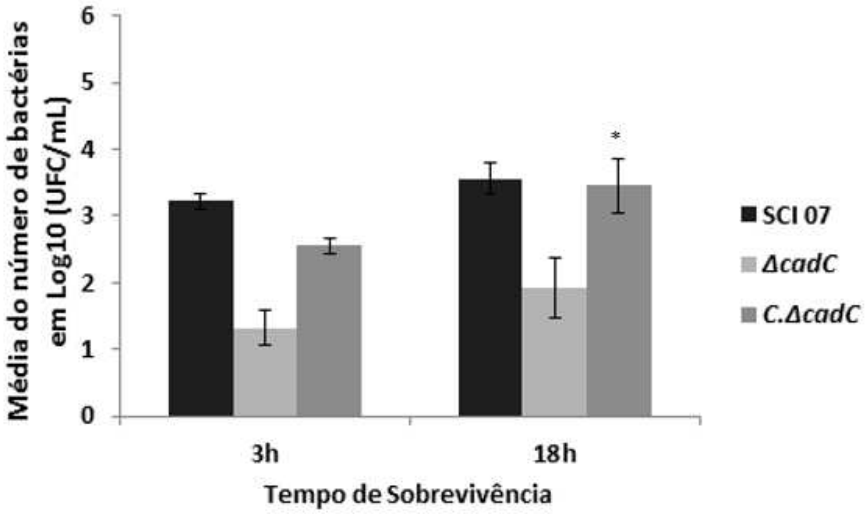
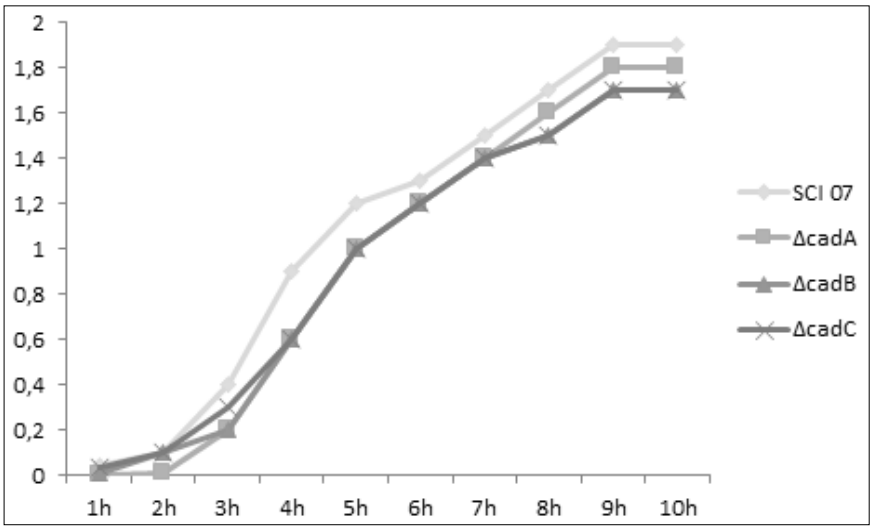


Figura 12. Sobrevivência bacteriana em células de macrófagos aviários (HD11) infectadas com o tipo selvagem (SCI-07), mutante (Δ*cadC*) e complementados (*C.*Δ*cadC*). Os macrófagos infectados foram lisados às 3 ou 18 horas após a infecção. Um asterisco indica significância estatística em p <0,05. (oftware SAS – Statistical Analysis Software).

5.5. Curva de crescimento do mutante atenuado

Com o intuito de descartar qualquer influência da taxa de crescimento das linhagens selvagem, mutantes e seus complementos, uma curva de crescimento foi realizada, obtendo-se a medida de crescimento através da leitura da densidade ótica em 600nm a cada meia hora, durante oito horas. Verificamos que não há nenhuma deficiência de crescimento por parte dos mutantes e complementos, o que sugere que atenuação está relacionada com alteração direta nas propriedades de virulência da linhagem.



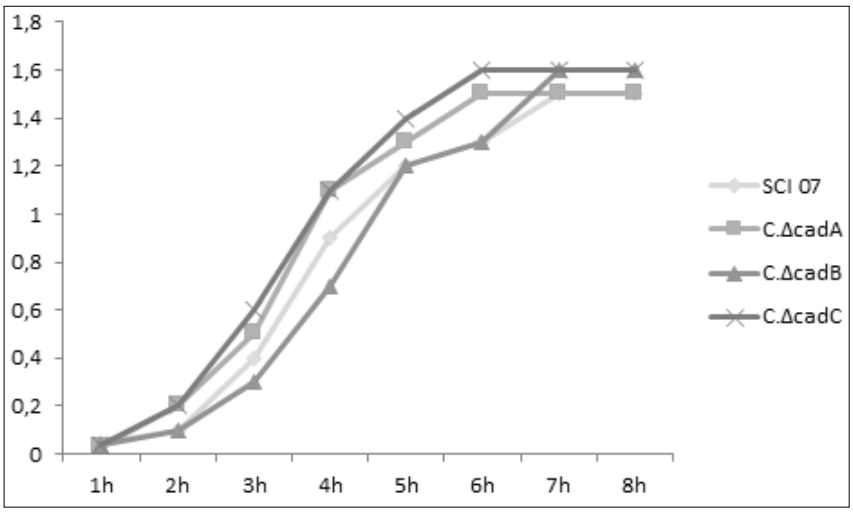


Figura 13. Curva de crescimento comparando a linhagem atenuada SCI-07 aos mutantes e seus complementos.

5.6. Avaliação da motilidade do tipo "Swimming".

Com o intuito de avaliar a influência das deleções no fenótipo de motilidade do tipo "swimming", que é um tipo de movimento produzido através da ação de flagelos, o diâmetro dos halos de motilidade em placas de LB contendo 0,3% de Ágar foi mensurado após 12 horas da inoculação com culturas das linhagens mutantes (*cadA, cadB e cadC*) complementos (*cadA, cadB e cadC*) e selvagem (SCI 07). Os três mutantes e seus complementos tiveram uma motilidade menor que o da linhagem selvagem, indicando comprometimento na motilidade pela deleção dos genes.

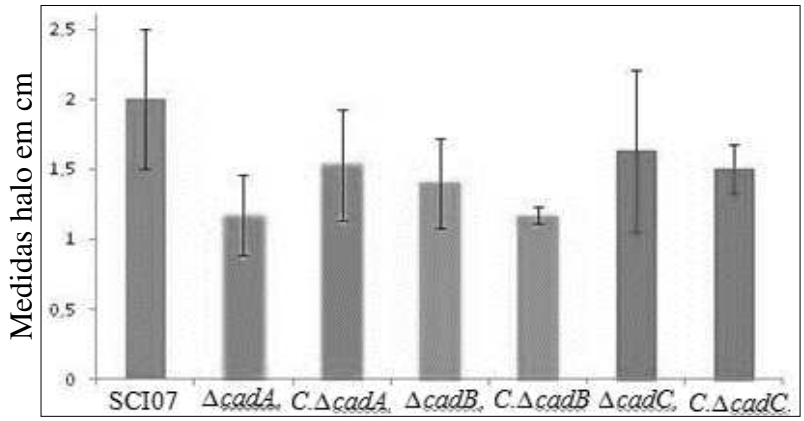
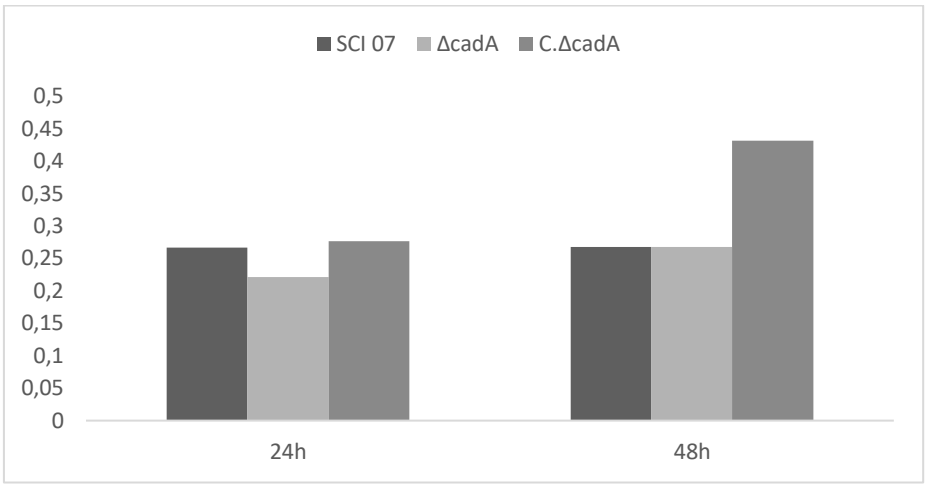


Figura 14: Ensaio de motilidade com SCI07, Δ*cadA, C.*Δ*cadA,* Δ*cadB, C.*Δ*cadB,* Δ*cadC,* e *C.*Δ*cadC*. O desvio padrão foi calculado de acordo com os resultados obtidos. Nenhuma das amostras foi estatisticamente significante em p <0,05. (Software SAS – Statistical Analysis Software).

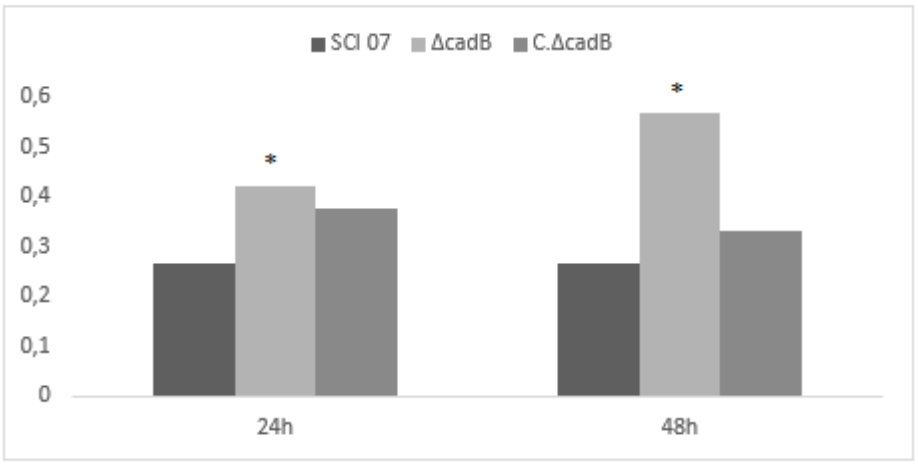
5.7. Ensaio de formação de biofilme

A formação de biofilme é influenciada pelo operon cad. Para a formação de biofilme observamos diferenças de crescimento entre as linhagens mutantes, complementadas e do tipo selvagem, em 24 e 48 horas após a inoculação e quantificadas usando coloração com cristal violeta. Nas figuras 15 (A, B e C) podemos observar que a formação de biofilme foi aumentada nos mutantes *ΔcadB e ΔcadC*. Além disso, ambos os mutantes produziram uma melhor adesão em 48 horas após a inoculação. Em contraste, a linhagem Δ*cadA* não obteve uma produção significativa de biofilme em comparação ao tipo selvagem, exceto em 48 horas pós incubação. Esses dados demonstram a importância crítica de mutações do operon cad no processo de formação de biofilme.

(A)


SCI 07
ΔcadA
C.ΔcadA
0,5
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
24h
48h

(B)


SCI 07
ΔcadB
C.ΔcadB
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
*
*
24h
48h

(C)

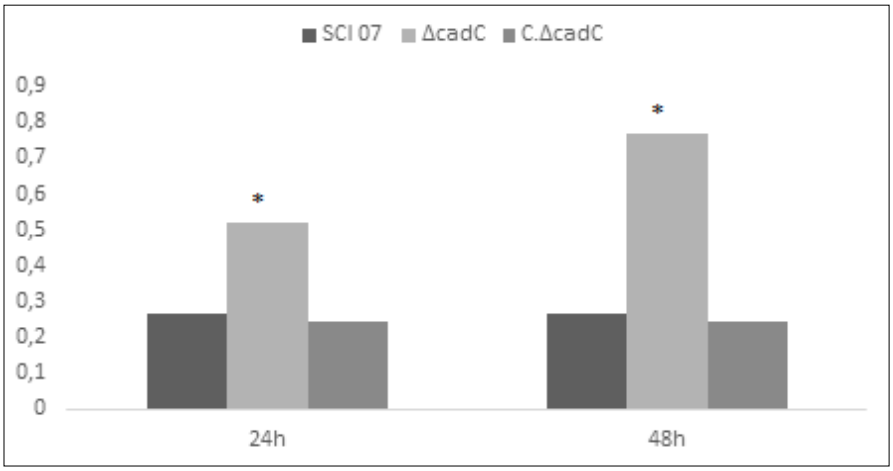


Figura 15: Formação de biofilme. As linhagens selvagem (SCI-07), mutantes e complementadas foram cultivadas em DMEM, por 24 e 48 horas em placas de poliestireno. (A) gráfico para Δ*cadA* e C.Δ*cadA*. (B) gráfico para Δ*cadB* e C.Δ*cadB*. (C) gráfico para Δ*cadC* e C.Δ*cadC*. Um asterisco indica significância estatística em p <0,05. (Software SAS – Statistical Analysis Software).

5.8. Avaliação da mortalidade em aves

Para verificar se os genes dentro do operon cad poderiam desempenhar um papel na virulência da linhagem SCI-07, ensaios de mortalidade e teste de infecção sistêmica foram realizados em galinhas Cobb line. As aves infectadas com a linhagem selvagem (SCI-07) apresentaram mortalidade de 75% no primeiro dia de observação chegando a 100% no terceiro dia. A linhagem mutante Δ*cadC* apresentou uma taxa de mortalidade de 55% durante os sete dias de experimentação, com 4 animais mortos já no primeiro dia de observação. Os outros mutantes apresentaram um comportamento similar ao do tipo selvagem. A linhagem C.Δ*cadC* mostrou uma restauração completa da patogenicidade com uma taxa de mortalidade global de 90%, com 10 animais mortos no primeiro dia (Figura 16 – A e B). Além disso, estes dados são também consistentes com os ensaios de infecção sistémica. Nas figuras 17, 18 e 19 demonstramos que Δ*cadC* apresentou menor contagem bacteriana no pulmão, baço e fígado, analisados 48 horas após a inoculação e sua virulência foi atenuada no C.Δ*cadC,* recuperando sua patogenicidade de forma semelhante à linhagem do tipo selvagem (p <0,05). Juntos, todos estes resultados indicam que o gene *cadC* tem uma grande influência no papel da virulência,

uma vez que na sua ausência, o número de mortalidade e o número de bactérias foram reduzidos.

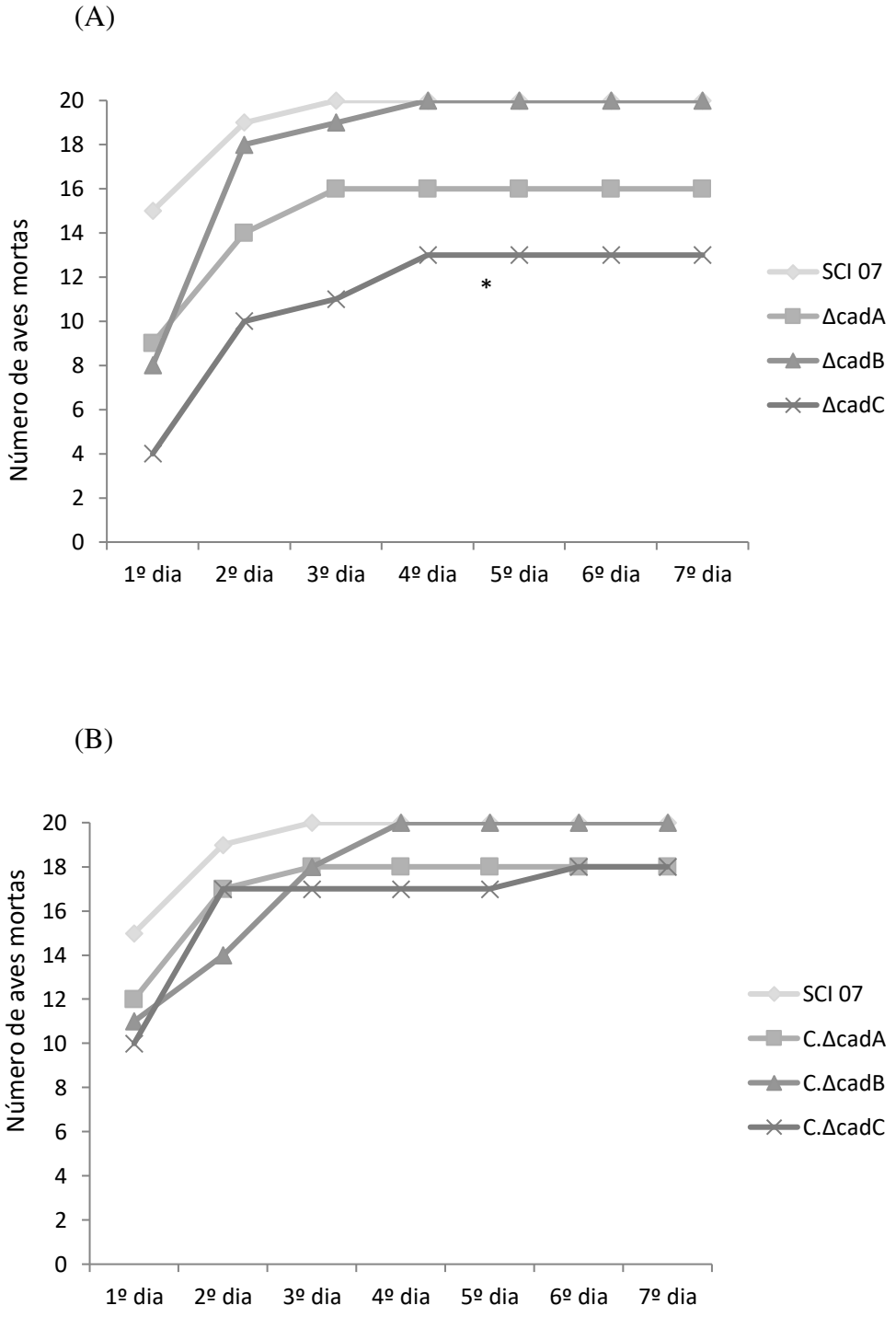


Figura 16. (A) Perfil de mortalidade das aves infectadas com 10^9 UFC/ml das linhagens SCI-07 e mutantes *(Δcad*A, *Δcad*B *e Δcad*C*).* Diferença estatística determinada pelo teste de Qui-Quadrado comparando os mutantes com a *linhagem* selvagem (* p<0,01). (B) Perfil de

mortalidade das aves infectadas com 10^9 UFC/ml das linhagens SCI-07 e complementadas *(C.ΔcadA, C.ΔcadB e C.ΔcadC)*..

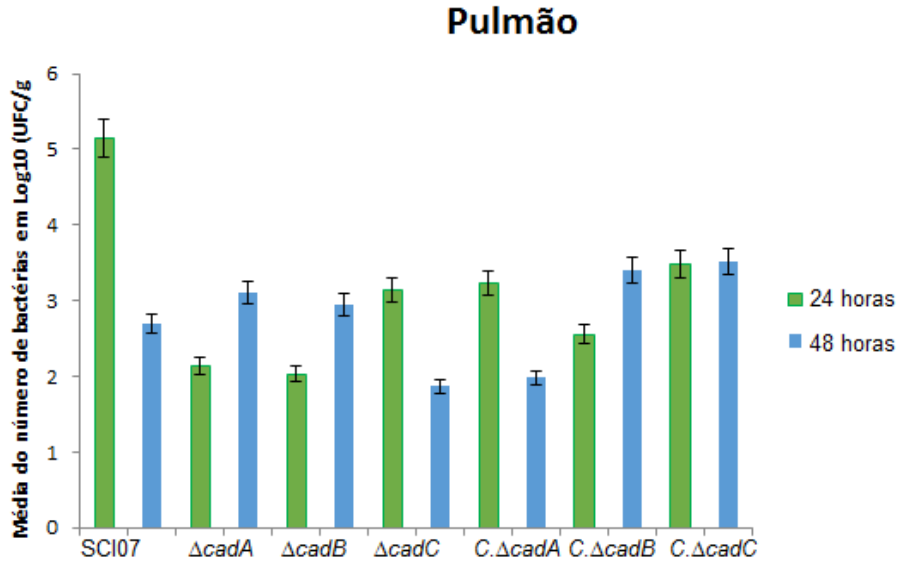


Figura 17: Teste de infecção sistemica no pulmão analisados em 24 e 48 horas. Os desvios padrão foram calculados de acordo com os resultados.

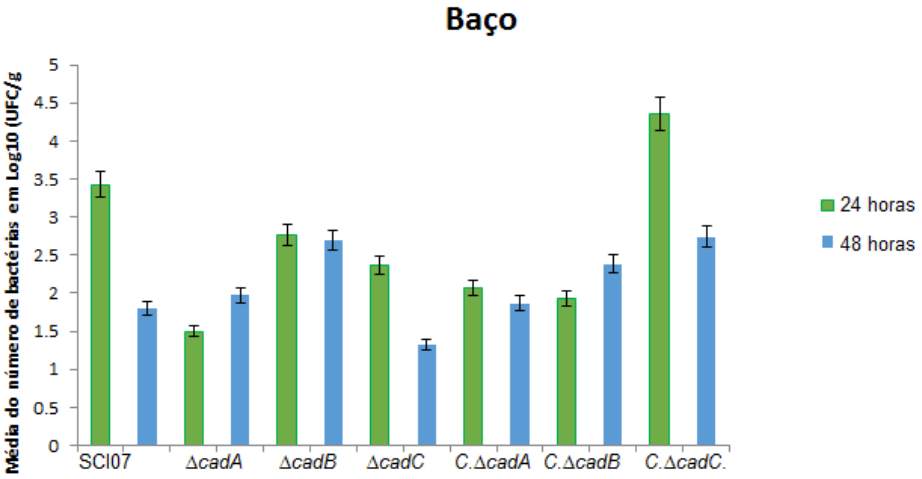


Figura 18: Teste de infecção sistemica no baço analisados em 24 e 48 horas. Os desvios padrão foram calculados de acordo com os resultados.

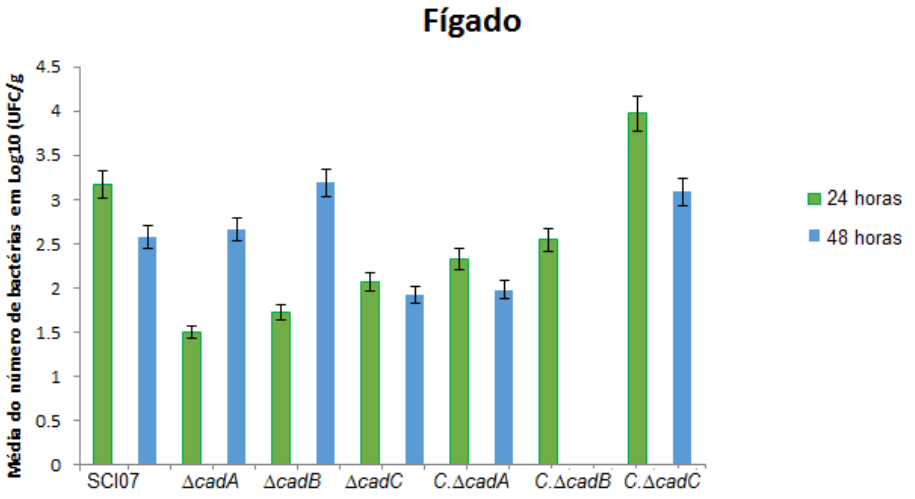


Figura 19: Teste de infecção sistemica no fígado analisados em 24 e 48 horas. Os desvios padrão foram calculados de acordo com os resultados.

5.9. Genes diferencialmente expressos em E. coli entre as linhagens *ΔcadC, C.ΔcadC* e tipo selvagem-SCI-07.

Foi analisado o efeito da mutação em linhagens Δ*cadC* com sua linhagem selvagem e complementada, para determinadar a principal busca por Genes Diferencialmente Expressos (DEGs), onde foram feitos estudos de transcriptomas através de dados de RNA-seq.

As leituras sequenciadas contaram uma média de 32,5 milhões de todas as três réplicas de cada amostra biológica (Tabela 4). Uma vez que todas as leituras mostraram alta qualidade e sem sinalizadores de baixa qualidade, todas foram usadas para mapear as diferenças em relação ao genoma de referência do genoma disponível para SCI-07 *E. coli*, resultando em 92,8% da taxa de alinhamento geral (Tabela 4).

Amostra	Total Reads	Taxa de alinhamento (%)
Δcadc – replicata1	36.993.579	92,96
Δcadc – replicata 2	31.616.561	92,89
Δcadc – replicata 3	29.445.195	92,97
C.Δcadc – replicata 1	31.332.304	92,19
C.Δcadc – replicata 2	29.774.284	92,62
C.Δcadc – replicata 3	30.392.933	92,10
Linhagem Selvagem – replicata 1	38.905.159	93,05
Linhagem Selvagem – replicata 2	30.583.817	93,61
Linhagem Selvagem – replicata 3	34.113.696	93,23

Os DEGs foram identificados como genes que exibem uma mudança maior do que a alteração de 1,5 vezes nos níveis de transcritos, com base na contagem de fragmentos brutos após a normalização da amostra, seguida por GLMs (Generalized Linear Models) para valores de p e FDR (taxa de descoberta falsa). Todos os DEGs foram classificados em ordem de p-valores e apenas aqueles que apresentaram p-valor <0,01 (ponto de corte a 1% FDR) foram considerados significativos para esta análise. Nosso estudo comparativo revelou que foram identificados 11, em ΔcadC (5 genes regulados para cima e 6 para baixo) (Figura 20).

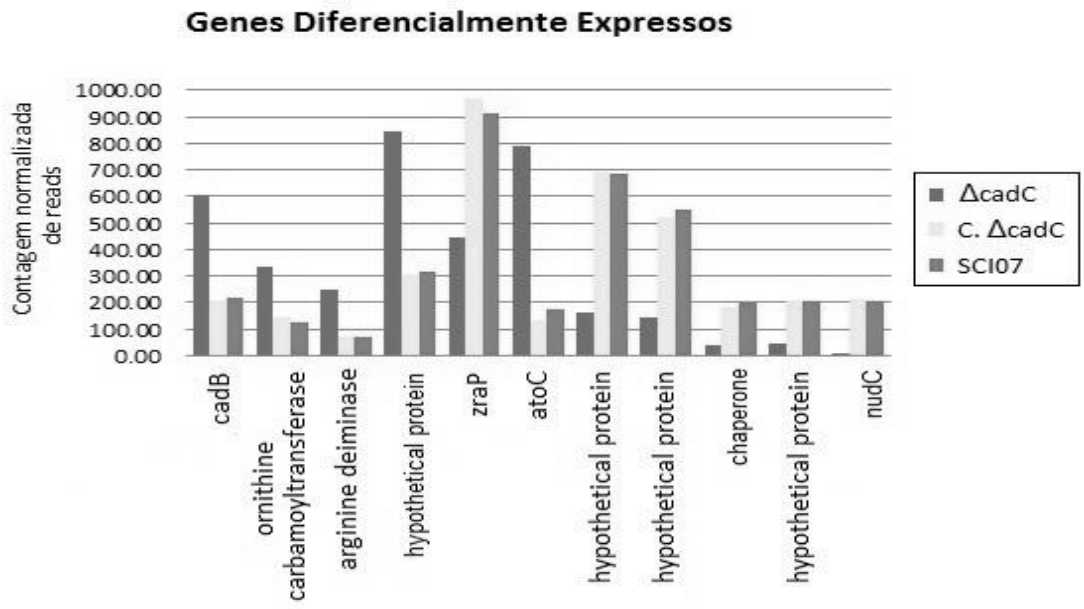


Figura 20. Padrões de expressão de 11 genes identificados nas amostras sequenciadas por RNA-Seq.

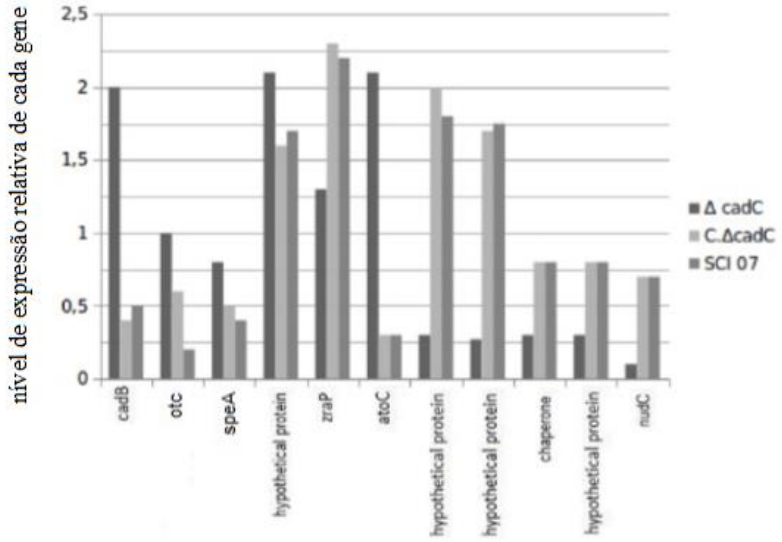


Figura 21. Níveis de expressão relativa de DEGs de *ΔcadC* pela técnica de qRT-PCR.

Analisando o gráfico podemos ver que o gene *cadB* mostrou um aumento na expressão de 3 vezes por RNA-Seq e 4 vezes por qRT-PCR em mutantes *ΔcadC*. Este dado demonstra que a supressão da parte reguladora do operon, ou seja, a deleção de *cadC* afetou diretamente sua expressão. Embora a mutação tenha sido direcionada para um único gene (*cadC*), as ORFs no conjunto de dados de RNA-seq e os resultados de qRT-PCR mostraram variabilidade na expressão de genes de outras vias metabólicas de diferentes direções.

Variações sutis foram observadas nos genes para expressão por RNA-Seq e qRT-PCR. Por RNA-Seq, os genes que codificam para *atoC*, chaperones e proteínas hipotéticas mostraram maior variabilidade entre *C.ΔcadC* e tipo selvagem, enquanto que, por qRT-PCR, esses genes mostraram basicamente a mesma expressão para essas amostras. Por outro lado, por qRT-PCR, a ornitina carbamoiltransferase, a arginina desiminase e duas proteínas hipotéticas mostraram um pouco mais de contraste na qRT-PCR do que nos resultados do RNA-Seq para as mesmas amostras. Apesar da pequena diferença na expressão desses genes, mudanças no transcriptoma do mutante em relação ao complemento e linhagem selvagem mostram possíveis novos genes alvo para pesquisa futura.

6. DISCUSSÃO

Acredita-se que, de maneira geral, as infecções causadas por APEC requeiram fatores predisponentes, que incluem condições ambientais e infecções primárias, principalmente virais, o que fariam com que estas amostras atuassem como agentes patogênicos secundários (Dho-MoulinandFairbrother, 1999).

Vários fatores de virulência já foram identificados em APEC. Estes fatores incluem a capacidade de produção de adesinas (fímbrias do tipo 1, P e curli) (Collinson et al., 1993; de Pace et al., 2010; Dozois et al., 1995; Ewers et al., 2007; Janben et al., 2001; Knöbl et al., 2001; Marc et al., 1998; McPeake et al., 2005; 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 et al., 2003; Janben et al., 2001), produção de toxinas com efeitos citopáticos (stx e vat) (Parreira and Gyles, 2002, 2003), resistência às defesas imunológicas do hospedeiro e sistemas de secreção (de Pace et al., 2010; Dho-Moulin and Fairbrother, 1999; Ewers et al., 2007; La Ragione and Woodward, 2002), embora nenhum conjunto específico de fatores de virulência associado ao fenótipo patogênico de APEC tenha sido descrito (Kaper et al., 2004).

Em *E. coli*, os diferentes patotipos, à exceção de APEC, possuem características específicas de patogenicidade (Kaper et al., 2004). Uma das características bioquímicas da Shigella e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (agentes etiológicos da shiguelose em humanos e que ajudava a diferenciar estes patógenos de outras linhagens entéricas) é a perda da capacidade da atividade lisina descarboxilase (Silva et al., 1980). A capacidade de produção da lisina descarboxilase é expressa em *E. coli* e em outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* sob condições de baixo pH, na presença de seu substrato específico (lisina), sendo o locus cad responsável pela descarboxilação da lisina.

O locus cadCBA consiste em três genes, *cadC, cadB e cadA*. Os genes *cadA* e *cadB* codificam, respectivamente, lisina descarboxilase e sua proteína antitransportadora. Estes dois genes constituem o operon cadBA. O gene *cadC* é localizado em seguida de *cadB e cadA* e codifica um regulador positivo para a expressão de *cadBA* através da percepção de sinalizadores induzidos pelo pH externo e lisina (Torres et al., 2009). Experimentos iniciados por Maurelli et al. (1998) demonstraram que a função do locus cad não é apenas a degradação do aminoácido lisina, mas possuindo papel na regulação de diferentes funções, incluindo a atividade de fator de "antivirulência" em alguns patógenos responsáveis por infecções entéricas em humanos e que sua ausência, por mutação, criaria a chamada mutação patoadaptativa (modificações genéticas que aumentam a "performance" do patógeno em um novo ambiente associado ao

hospedeiro) (Maurelli, 2007). Maurelli et al. (1998) demonstraram que a introdução do gene cadA em *Shigella flexneri* (LDC-) causou a atenuação da virulência, diminuição da produção de enterotoxina e diminuição de sua capacidade invasiva em cultura celular, principalmente devido ao bloqueio da capacidade deste organismo em estimular a migração transepitelial de leucócitos polimorfonucleares (LPMN), com consequente alteração da resposta inflamatória e posterior diminuição da interação deste patógeno com o citoesqueleto celular (Fernandez et al., 2001). O gene *cadA*, atuaria, portanto, em *Shigella* como um gene de antivirulência.

Estudos posteriores (Day et al., 2001) demonstraram que o fenótipo LDC- era devido a uma grande deleção, de aproximadamente 90Kb, no cromossomo de *S. flexneri*, próxima ao gene *cadA*. Deleções semelhantes, em maior ou menor extensão, também foram localizadas em outras enterobactérias LDC-, incluindo EIEC e STEC (*E.coli* produtora de toxina Shiga) (in: Torres et al., 2009). Jores et al. (2006) também demonstraram que este fenótipo não é exclusivo destes tipos bacterianos, podendo ser encontrados em *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli*enterotoxigênica(ETEC).

De maneira geral, além dos resultados descritos acima, verificou-se que este operon influencia positivamente o aumento da adesão em STEC O157:H7 (Torres e Kaper, 2003), aumenta a competição desta amostra em condições *in vivo* (Ritchie e Waldor, 2005); influencia negativamente a adesão de linhagens STEC O111 (Torres et al., 2005) e outras linhagens de *E. coli* diarreogênicas (O111:NM, O111:H8, O26:NM); estimula a produção de poliaminas, que protegem *E. coli* uropatogênica (UPEC) contra os efeitos deletérios dos radicais tóxicos do nitrogênio produzidos pelas células hospedeira; protege *Salmonella* e *E. coli* contra condições ácidas; estimula o sistema GadABC (glutamato dependente) em células de *E. coli*, em condições de estresse alimentar (Moreau, 2007); contribui para a sobrevivência de *Salmonella Typhimurium*em em tecidos específicos do hospedeiro (Heithoff et al., 1997) e contribui positivamente para a tolerância ao ácido em *Vibrio vulnificus* (Rhee et al., 2002; Rhee et al., 2005). Em resumo, as mutações no operon cad podem produzir um efeito "patoadaptativo" em diferentes patógenos bacterianos, influenciando, positivamente ou negativamente a expressão de certos genes ou grupos de genes, alterando de maneira significativa a relação patógeno-hospedeiro e, por extensão, a patogenicidade e virulência. Neste trabalho, nossa pergunta inicial, haja vista a existência de linhagens APEC bem caracterizadas por nosso grupo, como por exemplo a linhagem SCI-07, incluindo-se aí o sequenciamento do DNA de seus genomas, foi se a inexistência do operon cad poderia influenciar positiva ou negativamente, a patogenicidade de linhagens APEC. Começamos os nossos estudos com linhagens APEC lisina

descarboxilase negativas, pertencentes ao nosso laboratório e isoladas de casos de aves com sinal clínico de septicemia.

Os experimentos iniciais demonstraram que o fenótipo lisina descarboxilase negativo, presente nestas linhagens, era devido a grandes deleções existentes nos genomas das mesmas, deleções estas que não se limitavam especificamente ao operon cad e, sim, que se expandiam além dos limites dos mesmos. Estes dados, contrariam aqueles de Casalino et al. (2010), que descreveram que o fenótipo LDC- em *E. coli* do tipo EIEC era devido, principalmente, à inserção de elementos de inserção (IS) no locus *cadC*, ou mutações pontuais na sua região promotora, mas corroboram os dados publicados por Torres, F. (2009) e Day et al. (2001), que demonstram a existência de grandes deleções em genomas de linhagens de *E. coli* do tipo STEC (O111) e *Shigella*, respectivamente. Desta maneira, optamos pela deleção sítio dirigida, individual, também devido ao tamanho dos genes, de cada um dos genes do operon cad e posterior análise de seus efeitos *in vivo* e *in vitro* na linhagem patogênica SCI-07 (de Paiva et al., 2014; 2016), tendo, inclusive, seu genoma sido sequenciado (Rojas et al., 2012) (GenBank database under accession number CP000468.1). Dados, também de nosso grupo, obtidos por de Pace et al. (2010; 2011), com o uso de microarranjo, foram utilizados neste trabalho para o melhor entendimento dos resultados obtidos. Todas as deleções realizadas ocorreram com sucesso, como o esperado, sendo confirmadas por experimentos de PCR. Vale ressaltar que em nenhum experimento *in vivo,* já descrito em *E.coli*, tenha demonstrado qualquer alteração na patogenicidade. Resultados foram obtidos apenas em experimentos envolvendo capacidade de adesão, invasão, expressão de fímbrias entre outros, por isso, acredita-se em efeito patoadaptativo com aumento de patogenicidade na ausência do operon cad. Assim, os resultados demonstraram claramente a diminuição da patogenicidade na ausência dos genes do locus cadABC, contrariando a hipótese vigente de fator patoadaptativo com aumento de patogenicidade na ausência deste locus (Maurelli et al., 2007).

Experimentos de crescimento bacteriano em meio de cultura demonstraram que a alteração da patogenicidade não era devida a um crescimento inapropriado da bactéria devido a alterações gerais do metabolismo. Os experimentos *in vitro* posteriores foram realizados com o objetivo de se verificar quais os possíveis mecanismos que levaram à diminuição da patogenicidade *in vivo*. As análises envolvendo experimentos de adesão em linhagem cultivada *in vitro* (HeLa), na ausência e na presença do análogo (methyl-alpha-Dmannopyranoside) não metabolizável do açúcar D-Manose e que bloqueia a adesão mediada por fímbrias do tipo 1, demonstraram uma mudança visualmente significativa da capacidade de adesão dos mutantes.

Na ausência deste análogo houve um aumento no número de células bacterianas aderidas e uma alteração no padrão de adesão a estas mesmas células, sendo este padrão semelhante ao observado em *E. coli* enteroagregativa que expressa fímbria AAF (in: Navarro-Garcia, F., 2014). Nossos resultados, nesse experimento, indicam a expressão de adesina(s) D- Manose sensível(eis). No experimento de adesão realizado na presença deste análogo, o padrão verificado no experimento anterior não foi observado, isto é, a adesão de células bacterianas em padrão semelhante ao de *E. coli* enteroagregativa, ocorrendo uma adesão positiva, porém com menor número de células bacterianas. Este padrão não foi alterado pelas mutações cad. Neste experimento foi possível observar a presença de células bacterianas alongadas, características da linhagem selvagem (SCI- 07) quando crescida na presença de D-Manose. A análise, por microarranjo e sequenciamento do genoma da amostra selvagem SCI-07 demonstrou a presença de várias outras possíveis adesinas em seu genoma que poderiam ser expressas nas condições aqui estudadas.

As análises envolvendo experimentos de invasão em linhagem celular cultivada *in vitro* (HeLa) indicaram uma diminuição, graficamente observável, na invasibilidade das linhagens mutantes Δ*cadA* e Δ*cadB*. Além disso, os experimentos de mortalidade e de formação de biofilme em superfície abiótica demonstraram diminuição das capacidades de motilidade e de formação de biofilme nos três mutantes estudados. A motilidade é considerada um fator de virulência em APEC, mas não é essencial para a patogenicidade, haja vista que a prevalência de flagelo em linhagens APEC é de somente 36,8% (McPeake et al., 2005). Trabalhos que relacionam a presença de flagelos com capacidade de patogenicidade em APEC atribuem aos mesmos a capacidade de penetração da camada de mucos em células epiteliais, adesão *in vitro* em células epiteliais, persistência no trato digestório de aves e promoção da sobrevivência intracelular (Smyth, 1988; Allen-Vercoe e Woodward, 1999, La Ragioneet al., 2000 Parkinson et al., 1983). Em *E. coli* enteropatogênica, a produção de flagelos é capaz de aumentar a eficiência da invasão epitelial, agindo principalmente como adesinas (Duan et al., 2012, 2013). Em trabalho prévio de nosso grupo (de Paiva et al., 2016) foi demonstrado em mutante para motilidade diminuída, no gene flagelar *flgE*, da mesma linhagem bacteriana um retardamento da mortalidade de aves de um dia de idade, nos dias iniciais do experimento. A mortalidade foi recuperada a partir do 4 dia pós infecção, mas este mutante apresentou uma capacidade diminuída de sobrevivência dentro de macrófagos HD-11 quando comparado com a linhagem selvagem. Resultados semelhantes foram descritos em trabalho envolvendo mutante de uma provável proteína de membrana, também de nosso grupo (Verma et al., 2018.)

Nos ensaios envolvendo a sobrevivência bacteriana em linhagens de macrófago HD11 verificou-se que a linhagem selvagem SCI-07 apresentava uma sobrevivência maior no tempo de 18 horas do que em 3 horas, ou seja, capacidade de se manter (não ser destruída pelo macrófago) e se multiplicar intracelularmente. Comparativamente, as linhagens mutantes Δ*cadA* e Δ*cadC* apresentavam um número de bactérias menor do que a selvagem no tempo de 03 horas mas com aumento do número de bactérias no tempo de 18 horas, ainda assim, menor do que a bactéria selvagem. No tempo de 18 horas a recuperação da linhagem Δ*cadC* foi, proporcionalmente, menor do que a linhagem Δ*cadA*. A linhagem Δ*cadB* apresentou número bacteriano intracelular menor do que a linhagem selvagem, em ambos os períodos, com decréscimo mais acentuado no tempo de 18 horas. A capacidade de formação de biofilme é uma das características fenotípicas na determinação de resistência a antimicrobianos, colonização e perpetuação de bactérias patogênicas em seus hospedeiros, sendo dependente, em parte, da presença de flagelos e motilidade bacteriana (In: Laverty et al., 2014). No experimento de formação de biofilme verificou-se que a linhagem selvagem possui uma capacidade maior de produção de biofilme em 24 horas do que em 48 horas. Este mesmo padrão foi observado nas diferentes linhagens mutantes, mas com aumento maior do que a selvagem em 24 horas mas menor para as linhagens Δ*cadA* e Δ*cadB* em 48 horas. Em 48 horas, a linhagem Δ*cadC* apresentou capacidade aumentada de produção de biofilme do que as demais linhagens, comparando-se com a linhagem selvagem.

Os ensaios de infecção sistêmica *in vivo*, com análise em 24 e 48 horas demonstraram que, em pulmão, baço e fígado, a linhagem SCI-07 apresenta infecção maior em 24 horas seguida de recuperação em 48 horas. Este comportamento foi invertido nos mutantes Δ*cadA* e Δ*cadB*, ou seja, menor recuperação de células bacterianas (infecção) em 24 horas e maior em 48 horas. Os resultados acima mostram, a princípio, um efeito genético pleiotrópico causado por cada um dos mutantes, ou seja, uma única mutação genética causando expressões gênicas diferentes. Este tipo de efeito pleiotrópico foi demonstrado para genes diferentes, em trabalhos publicados por nosso grupo (Verma et al., 2015; 2018), onde a mutação de um único gene alterou a expressão de muitos outros, incluindo a patogenicidade. Como se sabe, o metabolismo bacteriano atua de maneira integrada, respondendo de maneira coordenada a estímulos ambientais como temperatura, osmolaridade, pH, disponibilidade de nutrientes, oxigênio, incluindo o ambiente presente em seu hospedeiro, neste caso, aves.

O locus cad*CBA* participa na descarboxilação da lisina. O gene *cadC* regula positivamente a expressão dos genes *cadAB* em resposta ao pH externo (baixo) e alta

concentração de lisina. O gene *cadC* é um regulador positivo, transcrito como uma proteína integral de membrana interna que age tanto como um sinal sensor quanto um regulador transcricional respondendo ao pH baixo e aos níveis de lisina (Casalino et al., 2010). O gene *cadA*, em meio interno, na presença de íons H+, descarboxila a lisina em cadaverina, promovendo a homeostase do pH interno enquanto o gene *cadB*, que é uma proteína da membrana bacteriana interna, antitransportadora, é responsável pela troca da cadaverina intra-bacteriana pela lisina (amino ácido essencial bacteriano) extracelular (Torres, 2009). Como descrito anteriormente, em *Shigella*, a cadaverina suprime a expressão total da invasibilidade, característica deste gênero bacteriano, inibindo a habilidade da bactéria em estimular a migração transepitelial de leucócitos polimorfonucleares (LPMN) e, portanto, alterar a resposta inflamatória e a capacidade de bactéria em lisar o vacúolo fagocítico (McCormick et al., 1999; Fernandez et al., 2001).

Linhagens diarreiogênicas de *E. coli* produtoras de toxina do tipo *shiga* (STEC), patogênicas para humanos, possuem e expressam inúmeros genes de patogenicidade. Apesar de todos os genes de virulência presentes nestas linhagens, a patogenicidade apenas se apresenta em sua totalidade com a expressão de genes de adesinas que permitem que a mesma se fixe e colonize o epitélio intestinal (Torres et al., 2005). Em um mutante LCD-(*cadA*) (enzima que descaboxila lisina) deste tipo bacteriano, Torres e Kaper (2003) verificaram uma capacidade aumentada de adesão, *in vitro*, o que indica que este locus pode alterar a expressão gênica de adesinas.

Os resultados de adesão demonstraram alterações na capacidade de expressão de adesinas, com alterações no tipo de adesão: surgimento de adesão do tipo observado em EAEC e no número de células bacterianas aderidas quando os experimentos foram realizados na ausência do análogo do açúcar D-Manose, que bloqueia adesão devido à presença de fímbrias do tipo 1, ou tipo 1 “like. Este padrão de adesão não foi revertido para o fenótipo mutante e sim para o fenótipo selvagem original, apenas na célula complementada com o gene *cadB*. Como descrito anteriormente, o gene *cadB* expressa uma proteína da membrana bacteriana interna, antitransportadora, responsável pela troca da cadaverina intra-bacteriana pela lisina (amino ácido essencial bacteriano) extracelular (Torres, 2009). A ausência da proteína *cadB* no respectivo mutante, poderia levar a um desequilíbrio da homeostase da membrana bacteriana interna, com alteração de suas propriedades de fluidez e transporte, reorganizando a expressão gênica geral, com expressão de outros genes (proteínas), incluindo adesinas anteriormente não expressas. Por outro lado, os mutantes Δ*cadC* (regulador) e Δ*cadA* (lisina descarboxilase)

quando complementadas com os respectivos genes não voltaram ao fenótipo selvagem original, mantendo o fenótipo mutante. O gene em comum a estas duas construções é o *cadA* que, na sua ausência ou na sua expressão em plasmídio (com número diferente de cópias daquele do cromossomo bacteriano) pode manter um desequilíbrio não compensatório do metabolismo intermediário bacteriano, com manutenção do fenótipo mutante. Esta hipótese deverá ser testada futuramente em nosso laboratório. Além disso, o efeito pleiotrópico apresentado pelos diferentes mutantes nos levou a verificar se estas mutações poderiam atuar, de maneira limitada ou mais pronunciada na regulação da expressão de outros genes. Estes estudos foram realizados por meio da análise global da expressão gênica (RNAseq). Assim, os genes que apresentaram expressão aumentada em relação à linhagem selvagem foram *cadB*, os genes que codificam para ornitina carboniltransferase, arginina desaminase, proteína hipotética e os genes *zraP* e *atoC*. Aqueles que apresentaram expressão diminuída em relação à linhagem selvagem foram os responsáveis pela expressão de três proteínas hipotéticas e *nudC*.

O gene *cadB* mostrou um aumento na expressão de 3 vezes pela técnica de RNA-Seq e 4 vezes pela técnica de RT-PCR em mutantes *ΔcadC*, um fato particularmente interessante, uma vez que demonstra que a supressão do operon (cadC) afetou positiva e diretamente, sua expressão. Apesar de existirem estudos que mostram a importância do gene *cadC* como um regulador positivo para a expressão do operon cad (Torres e Kaper, 2008), o nosso estudo mostrou efetivamente, que a atividade do gene *cadA* foi inibida no mutante *ΔcadC* e que o gene *cadB* sofreu um aumento significativo em sua expressão. Este fato nos mostra que a supressão dessa parte regulatória do operon não inibiria completamente a atividade da região *cadBA*, responsáveis diretos pela síntese de cadaverina, produto metabólico da degradação de L-lisina. Além disso, confirmamos por ensaios bioquímicos, que a atividade da linhagem permanecia lisina positiva. Assim, podemos sugerir que o papel de regulador transcricional realizado por *cadC* poderia ser também realizado por *cadB*, contrariando o estudo de Casalino et al. (2002), onde os autores descrevem que a mutação levaria a uma inativação permanente do fenótipo produzido por lisina descarboxilase em mutantes *ΔcadC*. Acreditamos que na ausência do gene *cadC*, o acúmulo de L-lisina no meio extracelular torna-se aumentado com a atividade regulatória do operon, tornando-se sobreregulada, explicando assim, o aumento da expressão do gene *cadB* para desempenhar essa função (Watson et al., 1992).

Os genes que tiveram sua expressão significantemente aumentada estão relacionados com fatores bioquímicos que influenciam o aumento da expressão do operon cad, sendo o fator essencial para que nesse processo ocorra a acidez do meio extracelular. Sendo a lisina um

aminoácido básico, a célula tentaria equilibrar o pH gerando aumento na expressão das enzimas descarboxilases. Campilongo et al. (2014) descreveram uma relação inversa entre a produção de cadaverina e putrescina em linhagens de *E. coli* e *Shigella*. Este trabalhou demonstrou uma maior sobrevivência em macrófagos naquelas linhagens lisina descarboxilase negativas e arginina descarboxilase positivas. No mutante *ΔcadC*, os resultados de expressão diferencial mostraram alta atividade de genes essenciais que participam no metabolismo de *E. coli* para a sua sobrevivência no ambiente ácido, mais especificamente no gene arginina descarboxilase, enzima que participa na via de degradação de L-arginina, importante na sobrevivência em ambientes ácidos e precursor de moléculas com grande importância biológica como ornitina, poliaminas, óxido nítrico, creatina, agmatina, glutamina e prolina, dentre outras (Chiarla *et al.,* 2006; Wilmore, 2004).

A liberação de putrescina, produto do metabolismo de L-arginina, também é gerada diretamente pela atividade do sistema ornitina descarboxilase (importante na síntese de putrescina a partir da reação catabólica de L-arginina, além de ser um precursor para a síntese de L-glutamina, L-prolina e poliaminas (putrescina, espermidina e espermina), transcrição observada com aumento de quase duas vezes na análise de RNAseq na ausência do gene *cadC*. As poliaminas são pequenas moléculas catiônicas que podem interagir com diversas estruturas aniônicas incluindo DNA, RNA e proteínas. Essas moléculas são consideradas como segundos mensageiros intracelulares, influenciando positivamente a síntese de proteínas e ácidos nucléicos e se tornando essenciais para a divisão celular normal e crescimento, além de atuarem como antioxidantes, protegendo as células de danos oxidativos (Munder *et al*,. 2009; Flyn et al., 2002). A transcrição aumentada da arginina descarboxilase, como observado em nossos experimentos, poderia, através de seus efeitos positivos, levar à compensação da perda da atividade lisina descarboxilase. Outro gene que mostrou um aumento de expressão (aproximadamente sete vezes na análise transcricional) foi o gene *atoC*, responsável pela degradação enzimática do acetoacetato à acetil coenzima A, favorecendo assim, a sobrevivência frente a ácidos graxos de cadeia curta. O acetil-CoA pode ser formado também, pela oxidação do piruvato (Pauli e Overath, 1972).

Os genes *atoD* e *atoA* codificam as subunidades de Acetil-CoA transferase e *atoB* codifica para a subunidade de tioliase II (Jenkins et al., 1987). Segundo Pauli e Overath (1972), a proteína AtoC possuiria uma função dupla, tanto como anti-enzima quanto inibidor pós translacional de enzimas biossintéticas de poliamina e regulador transcricional de genes envolvidos em catabolismo de ácidos graxos de cadeia curta favorecendo, assim, a

sobrevivência frente a estes ácidos. Análises de transcriptoma sugerem que o sistema AtoSC está, também, envolvido em outras funções celulares e que a sua inibição produziria uma evidente redução de motilidade, sensibilidade a sais e susceptibilidade a fatores ambientais (Yamamoto et al., 2005). Recentemente foi avaliado, *in silico*, que a atividade do sistema AtoSC é muito mais complexa e importante porque atuaria como um regulador global na expressão do genoma bacteriano (Pilalis *et al*., 2011). O papel da proteína hipotética que apresentou aumento significativo de expressão ainda não está claro e avaliações genômicas e proteômicas com relação a esta proteína ainda estão em análise. Por outro lado, houve uma subexpressão da proteína ZraP. O gene responsável por esta proteína pertence ao sistema ZrapSF, que também pertence à família de sistemas de transdução de sinais de dois componentes. Acredita-se que este sistema participe do balanço de zinco protegendo o citoplasma de cargas excessivas de zinco, sequestrando este íon metálico para o espaço periplasmático. Este sistema controla a expressão da proteína acessória ZraP, que seria uma proteína "scavenger" do periplasma, produzindo uma resposta ao estresse causado pelo excesso de zinco. A proteína ZraP, que atua como chaperona, está correlacionada com o transporte intracelular bacteriano, transdução de sinal e manutenção da homeostase (Bliven *et al.,* 2012). O envelope bacteriano é a interface com o ambiente circundante, sendo consequentemente, submetido a agentes nocivos, incluindo uma gama de compostos com atividade antimicrobiana. As vias ESR (resposta ao estresse do envelope) de bactérias entéricas são críticas para a manutenção do envelope contra esses agentes antimicrobianos. A proteína periplásmica ZraP contribui para a homeostase do envelope celular bacteriano com função de chaperona e reguladora em *Salmonella Typhimurium* (Breazeale et al., 2002). O mecanismo chaperona ZraP é catalítico, independente da ATP e dependente da presença de zinco, responsável pela estabilização do complexo de ZraP (membro da família bacteriana CpxP de proteínas periplasmáticas) (Frausto et al., 2001) oligomérico. Além disso, a proteína ZraP pode atuar reprimindo o sistema regulatório de dois componentes ZraSR, sensível às concentrações de zinco. As bactérias adquirem Zn2+ do ambiente e os níveis de concentração celular são controlados por sistemas de homeostase de zinco. Em comparação com outros sistemas homeostáticos, o sistema ZraSR de dois componentes é mais eficiente em responder às concentrações exógenas de zinco (Masuda, 2003). No nosso trabalho, a subexpressão de ZraP poderia levar a uma diminuição do papel de "scavenger" na célula bacteriana mutante, causando estresse celular com consequente alteração da homeostase celular. O gene *nudC* apresentou diminuição significativa em sua expressão. Este gene pertence à família de expressão de

proteínas hidrolases, evitando o acúmulo de metabólitos endógenos potencialmente deletérios e modulando o acúmulo de intermediários bioquímicos. Seu papel fisiológico porém, ainda é desconhecido (Hofer et al., 2017; Cahová et al., 2015).

Outras proteínas chaperonas e dois grupos de proteínas hipóteticas também evidenciaram uma diminuição de quase duas vezes em nossos experimentos. Suas funções nos mutantes estudados neste trabalho ainda estão sendo pesquisadas. Assim, as mutações no operon cad*CBA* produziram diferentes alterações fenotípicas e de patogenicidade nas linhagens mutantes, indicando um efeito pleiotrópico. As alterações fenotípicas incluíram alterações no padrão e na capacidade de adesão, motilidade, formação de biofilme, sobrevivência nas células de defesa do hospedeiro e, principalmente, diminuição da mortalidade (patogenicidade). Houve alteração na expressão de vários genes, indicando um efeito patoadaptativo de redução de patogenicidade e não de aumento da mesma. Estes resultados são contrários aos publicados até o momento, envolvendo linhagens bacterianas patogênicas. Nossos resultados são cientificamente importantes e podem contribuir de maneira significativa para o entendimento da patogenicidade de APEC.

7. Conclusão

Em conclusão, os mutantes *cadA* tiveram uma redução na motilidade e na formação de biofilme, e o mutante *cadC* influencia positivamente, visto que teve uma diminuição significativa nas mortes das aves. No entanto, sugerimos que os genes do operon cad estão diretamente envolvidos com a patogenicidade em cepas de APEC.

8. Referências Bibliográficas

ALLEN-VERCOE, E., WOODWARD, M.J. The role of flagella, but not fimbriae, in the adherence of Salmonella enterica serotype Enteritidis to chick gut explant. **J Med Microbiol**, 48, 771–780, 1999.

ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. **Saúde aviária e doenças**. Ed. Rocca Ltda, São Paulo, cap. 6, p. 41-51, 2007.

ARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de Escherichia coli de origem aviária**. Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.69, p.1-5, 2002.

ASSIS, A. C. B.; SANTOS, B. M. Patogenicity In Vivo*In vivo* and In Vitro of Escherichia Coli Samples from Avian Origin. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.3, n.2, 2001.

AZIZ, RK, BEST, AA, GLAS, EM,. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, Feb 8;9:75, 2008

BARCELOS, A. S. Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (Gallusgallus) condenados no abate pela inspeção sanitária. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.83 f., 2005.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis In: SAIF W. M**. Diseases of Poultry**, p. 138-144, 2003.

BARNES, H.J.; GROSS, W.G. Colibacillosis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W. M.; YODER, Jr, H.W. Diseases of poultry. **Iowa Sate University Press**, p.138-44, 1997.

BEARD, T.D. Jr., KING, R.M., GILBERT, S.J. Prediction of angler catch rates based on walleye population density. **North American Journal of Fisheries Management** v.17: p.621–627, 1997.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F**. Doenças das Aves**, 2ª ed., Ed. FACTA, Campinas, 2009.

BEST, A.; LA RAGIONE, R. M.; COOLEY, W. A.; O'CONNOR, C. D., VELGE, P.; WOODWARD, M. J. Interaction with avian cells and colonization of specific pathogenfree chicks by Shiga-toxin negative Escherichia coli O157:H7 (NCTC 12900). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 93, p. 207-222, 2003.

BEUG H, VON KIRCHBACH A, DÓDERLEIN 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, p.375-390, 1979.

BLIVEN, K.A., MAURELLI, A.T. Antivirulence genes: insights into pathogen evolution through gene loss. **Infect. Immun**. v.80: p. 4061–4070, 2012.

BREAZEALE, S.D., RIBEIRO, A.A., RAETZ, C.R. Oxidative decarboxylation of UDP glucuronic acid in extracts of polymyxin-resistant *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem**, 277, 2886-2896, 2002.

CAMPILONGO, R., Di MARTINO, M.L., LEUZZI, A. Molecular and functional profiling of the polyamine content in enteroinvasive E. coli: looking into the gap between commensal E. coli and harmful Shigella. **PLOS ONE** v. 9: p.106589 - 10.1371, 2014.

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

CARDOSO, A. L. S. P., TESSARI, E. N. C., CASTRO, A. G. M. & ZANATA, G. F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. **Arquivos do Instituto de Biologia,** v.69, n.2, p.1-5, 2002.

CASALINO, M., LATELLA, M.C., NICOLETTI, M., COLONNA, B. Inmterference of the *CadC* regulator in the arginine-dependent acid resistance system of *Shigella* and enteroinvasive *E. coli*. Inter **J Med Microbiol**., 300:289-295, 2010.

CHEN, Y.G., SHEN Y. LC/MS analysis of cellular RNA reveals NADlinked RNA. **Nat Chem Biol,**.5, 879–881, 2005.

CHIARLA, C.; SIEGEL, J.H. Plasma arginina and correlations in trauma and sepsis. **Amino Acids,**30, 81-86, 2006.

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 Staphylococcus to medical devices**. Journal of Clinical Microbiology** v.22, p.996-1006, 1985.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol** 66, 4555 – 4558, 2000.

DATSENKO, KA; WANNER, BL. One-step inactivation of chromossomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA,** v.97, p. 6640-6645, 2000.

DAY, W.A., Jr., FERNANDEZ, R.E., MAURELLI, A.T. Pathoadaptive mutations that enhance virulence: genetic organization of the cadA regions of Shigella spp. **Infection and Immunity** v.69, p.7471-7480, 2001.

de PACE F., NAKAZATO G., PACHECO A., de PAIVA J. B., SPERANDIO V., da SILVEIRA W. D. The type VI secretion system plays a role in type 1 fimbria expression and

pathogenesis of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity** v.78, p.4990–4998, 2010.

de PACE, F., NAKAZATO, G., PACHECO, A., BOLDRIN de Paiva, J., DIAS da Silveira, W., SPERANDIO, V. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic Escherichia coli (APEC) strain. **Microbiol.** 157, 2954-2962, 2011.

de PAIVA, J.B., MENDES da Silva, L., CASAS, M.R.T., CONCEIÇÃO, R.A., NAKAZATO, G., de PACE, F., SPERANDIO, V., DIAS da Silveira, W.. n Vivo Influence of in Vitro Up-Regulated Genes in the Virulence of an Apec Strain Associated with Swollen Head Syndrome. **Avian Patholol,** 29,. 1-40, 2016.

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

DIAS da Silveira, W., FERREIRA, A., BROCCHI, M., LANCELOTTI, M. Biological characteristics and pathogenicity of avian Escherichia coli strains. **Vet Microbiol** 85, 47-53, 2002.

DIPINETO, L.; SANTANIELLO, A.; FONTANELLA, M.; LAGOS, K. FIORETTI, A.; MENNA, L. F. Presence of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 in living layer hens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, p. 293-295, 2006.

DOZOIS, C. M., POURBAKHSH, S. A., FAIRBROTHER, J. M. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic Escherichia coli from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 297-309, 1995.

DOZOIS, C.M., CURTISS, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic Escherichia coli strain. **Proc Nat Acad of Sci USA** 100, 247-252, 2003.

DROUAL, R., WOOLCOCK, P.R. Swollen head syndrome associated with *E. coli* and infectious bronchitis virus in the Central Valley of California. **Avian Pathol.** 733–742, 1994.

DUAN, Q., ZHOU, M., P.R., ZHU, G. Contribution of flagellin subunit FliC to piglet epithelial cells invasion by F18ab E. **Vet Microbiol** 166, 220-224, 2013.

EWERS, C., PHILIPP, H.-C. Molecular epidemiology of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Vet Microbiol** 104, 91-101, 2004.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ANTAO, E. M. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology.** v. 297, p.163–76, 2007.

FARIAS, M.T. Tipagens sorológicas de amostras de Escherichia coli isoladas de aves em municípios do Rio Grande do Sul. **Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor,** v.6, p.65–71, 1980.

FERNANDES, N. C.; AKITI, T.; BARREIROS, M. G. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 83-85, 2001.

FERNANDEZ, I.M., SILVA, M., SCHUCH, R., WALKER, W.A., SIBER, A.M., MAURELLI, A.T. Cadaverine prevents the escape of Shigella flexneri from the phagolysosome: a connection between bacterial dissemination and neutrophil transepithelial signaling. **J Infect Dis** 184, 743-753, 2001.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR A.; SILVA, E. N., Di FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Ed.). **Doença das Aves**. 2th ed. Campinas: FACTA, cap. 4.2, p. 457-471, 2009.

FERREIRA, A.J.P. & KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA. p.197-205, 2000

FERREIRA, A.J.P. Fatores de patogenicidade de Escherichia coli de origem aviária: estudo comparativo entre amostras patogênicas e apatogênicas. **Dissertação de Mestrado** - São Paulo:USP, 1989.

GOMIS, S.M.; GOODHOPE, R.; KUMOR, L.; CADDY, N.; RIDDELL, C.; POTTER, A.A.; ALLAN, B.J. Isolation of Escherichia coli from cellulitis and other lesions of same bird in broilers at slaughter. **Canadian Veterinary ,Journal,** v.38, p.159–162, 1997.

GROSS, W.G. Diseases due to E. coli in Poultry. In: GYLES, C.L. Escherichia coli in domestic animals and humans. **CAB International: Oxon**, p.237–59, 1994.

HEITHOFF, D.M., CONNER, C.P., HANNA, P.C., JULIO, S.M., HENTSCHELl, U., MAHAN, M.J. Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression**. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,** v.94, p.934-939, 1997.

HEITHOFF, D.M., CONNER, C.P., HANNA, P.C., JULIO, S.M., HENTSCHELl, U., MAHAN, M.J. Bacterial infection as assessed by in vivo*in vivo* gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences,USA,**v.94, p.934-939, 1997.

HEMSLEY, R.V.; BARNUM, D.A.; INGRAM, D.G. Biochemical and serological studies of avian strains of Escherichia coli . **Avian Diseases,** v.11, p.90–97, 1967.

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

JENKINS, D.J., WOLEVER, T.M., TAYLOR, R.H. Starchy foods and glycemic index. **Diabetes Care**, 11, 149-159, 1987.

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

JORES, J., TORRES, A.G., WAGNER, S., TUTT, C.B., KAPER, J.B., WIELER, L.H. Identification and characterization of "pathoadaptive mutations" of the cadBA operon in several intestinal Escherichia coli. **International Journal of Medical Microbiology**

JORES, J., TORRES, A.G., WAGNER, S., TUTT, C.B., KAPER, J.B., WIELER, L.H. Identification and characterization of "pathoadaptive mutations" of the cadBA operon in several intestinal Escherichia coli.**International Journal of Medical Microbiology**

JOYA, J. E.; TSUJI, T.; JACALNE, A. V.; ARITA, M.; TSUKAMOTO, T., HONDA, T.; MIWATANI, T. Demonstration of enterotoxigenic Escherichia coli in diarrheic broiler chicks. **European Journal of Epidemiology**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 88-90, 1990

KAADEN, O.R.; S. LANGE; B. STIBUREK, Esrablishment and characterization of chicken embryo fibroblast clone LSCC-H32. **In vitro** v. 18, p. 827-834, 1982.

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

KAUFFMANN, F. The serology of the coli group**. International Journal of Medical Microbiology,** v.57, p.71-100, 1947.

KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de Escherichia coli isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.45, p.54-60, 2001.

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

LEITHNER, G.; HELLER, E. D. Colonization of Escherichia coli in young turkeys and chickens. **Avian Diseases**, v. 36, p. 211-220,1992.

MALUTA, R. P. ; LOGUE, C. M. ; TIBA, M. R. ; MENG, T. ; GUASTALLI E. A. L. ; ROJAS, T. C. G. ; MONTELLI, A. C. ; SADATSUNE, T. ; RAMOS, M. C. ; NOLAN, L. K. ; DIAS DA SILVEIRA, W. . Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) Escherichia coli Isolated in Brazil. **Plos One**, v. 9, p. e105016, 2014.

MARC, D.; ARNÉ, P.; BRÉE, A.; DHO-MOULIN, M. Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of Escherichia coli. **Research in Microbiology**, Paris, v. 149, n. 7, 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, p.51–59, 2011.

MAURELLI, A. T., FEMANDEZ, R. E., BLOCH, C. A., RODE, C. K. & FASANO, A. 'Black holes' and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*.**Proceedings of the National Academy Sciences,USA,**v.95, p.3943–3948, 1998.

MCPEAK, S. J. W.; SMYTH, J. A.; BALL, H. H. Characterization of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from health birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p.245-253, 2005.

MOREAU, P.L. The lysine decarboxylase CadA protects Escherichia coli starved of phosphate against fermentation acids. **Journal of Bacteriology,** v.189, p.2249-2261, 2007.

MOREIRA, H. O. M. Isolamento de *Escherichia coli* ácido-resistentes em fezes de bovines submetidos à dieta de volumoso e concentrado. **Dissertação – Mestrado em Zootecnia**. Universidade de Brasília. 60p., 2007.

MUNDER, M.; CHOI, B.S., ROGERS, M., KROPF, P. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. J Immunol, 16, 3771-7, 1999.

NAKAZATO, G.; AMABILE DE CAMPOS, T.; STEHLING, G.E.; BROCCHI, M.; DIAS DA SILVEIRA, W. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v.29, p. 479-486, 2009.

NGELEKA, M.; KWAGA, J.K.P.; WHITE, D.G.; WITTAM, T.S.; RIDDELL, C.; GOODHOPE, R.; POTTER, A.A.; ALLAN, B. Escherichia coli cellulitis in broiler chickens: Clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. **Infection of Immunity**., v.64, p.3118–26, 1996.

OLIVEIRA, W.F. *et al*. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias,** v.99, p.211-214, 2004.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.699-704, 1992.

PAIVA, J. B.; PENHA FILHO, R. A. C.; BERCHIERI JR., A. Estudo sobre a prevenção da infecção de aves. 2007, Indaiatuba-SP. **Anais – Congresso de produção, comercialização e consumo de ovos.** São Paulo: Associação Paulista de Avicultura. p. 62-63, 2014.

PARREIRA V.R.; GYLES C.L. 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. 64, p.3118-3126, 2003.

PEIGHAMBARI, S.M.; VAILLANCOURT, J.P.; WILSON, R.A.; GYLES, C.L. Characteristics of Escherichia coli isolates from avian cellulitis. **Avian Diseases**, v.39, p.116–24, 1995.

POURBAKHSH, S. A.; BOULIANNE, M.; MARTINEAU-DOIZ, B.; FAIRBROTHER, J. M. Virulence mechanisms of avian fimbriated Escherichia coli in experimentally inoculated chickens. **Veterinary Microbiology**. v.58, p. 195-213, 1997.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C**. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1ª ed. Porto Alegre, p.512, 2005.

REVOLLEDO, L. Clostridioses. IN: REVOLLEDO, L., FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**, Ed. Manole Ltda, Barueri, cap. 6, p. 62-66, 2009.

RHEE, J.E., KIM, K.S., CHOI, S.H. CadC activates pH-dependent expression of the Vibrio vulnificus cadBA operon at a distance through direct binding to an upstream region. **Journal of Bacteriology,**v.187, p.7870-7875, 2005.

RHEE, J.E., RHEE, J.H., RYU, P.Y., CHOI, S.H. Identification of the cadBA operon from Vibrio vulnificus and its influence on survival to acid stress. **FEMS Microbiology Letters,** v.208, p.245-251, 2002.

RITCHIE, J.M., WALDOR, M.K. The locus of enterocyte effacement-encoded effector proteins all promote enterohemorrhagic Escherichia coli pathogenicity in infant rabbits. **Infection and Immunity,** v.73, p.1466-1474, 2005.

RODRIGUES, V.S.; VIDOTTO, M.C.; FELIPE, I.; SANTOS, D.S.; GAZIRI, L.C. Apoptosis of murine peritoneal macrophages induced by na avian pathogenic strain of Escherichia coli. **FEMS Microbiology Letters**, v.179, p. 73–78, 2008.

ROJAS T.C.G., Parizzi L.P., TIBA M.R., CHEN L., PEREIRA G.A., SANGAL V., YANG J., YU J. & DIAS DA SILVEIRA, W. Draft genome of a Brazilian avian-pathogenic *Escherichia coli* strain and in silico characterization of virulence-related genes. **Journal of Bacteriology**, v.194, p.3023, 2012.

SCHOENI. J. L.; DOYLE. M. P. Variable colonization of chickens peorrally inoculated with Escherichia coli O157:H7 and subsequent contamination of eggs**. Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2958-2962, 1994.

SKYBERG, J. A.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, C. W.; WOOLEY, R. E.; GIBBS, P. S. NOLAN, L. K. Characterizing Avian Escherichia coli Isolates with Multiplex Polymerase Chain Reaction**. Avian Diseases**, v. 47, n. 4, p. 1441–1447, 2003.

SOJKA, W.J.; CARNAGHAN, R.B.A. Escherichia coli infection in poultry. **Research in Veterinary Science,** v.2, p.340–52, 1961.

STAVRIC, S.; BUCHANAN, B.; GLEESON, T. M. Intestinal colonization of young chicks with Escherichia coli O157:H7 and other verotoxin-producing serotypes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 5, p. 557-563, 1993.

TORRES, A.G., KAPER, J.B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 to HeLa cells. **Infection and Immunity,** v.71, p. 4985-4995, 2003.

TORRES, A.G., KAPER, J.B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 to HeLa cells. **Infection and Immunity,**v.71, p. 4985-4995, 2009.
v.296, p.547-552, 2006.

VERMA, R., ROJAS, T.C.G., MALUTA, R.P., LEITE, J.L., NAKAZATO, G., DIAS da Silveira, W.Role of hypothetical protein YicS in the pathogenicity of Avian Pathogenic Escherichia coli in vivo and in vitro. **Microbial Res** (in press), 2018.

VIDOTTO, M.C.; MÜLLER, E.E.; De FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.A.; GUIMARÃES, I.G.; SANTOS, D.S. Virulence factors of avian Escherichia coli. **Avian Dieases,** v.34, p.531–538, 1990.

YAMAMOTO, Y., UGAI, K., TAKAHASHI, Y. Efficiency of hand drying for removing bacteria from washed hands: comparison of paper towel drying with warm air drying. Infect Control Hosp Epidemiol. v.26: p.316–320, 2005.

WALTERS, M.; SIRCILI, M.P.; SPERANDIO, V. AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology,** v. 188, p. 5568-5680, 2006.

ZERBINO DR, BIRNEY E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Res**. 18:821–829, 2008.

9. ANEXO

9.1. Declaração de direitos autorais.

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada

ANÁLISE DA AÇÃO DO SISTEMA LISINA DESCARBOXILASE EM UMA LINHAGEM DE ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICA PARA AVES (APEC) CAUSADORA DE SÍNDROME DE CABEÇA INCHADA , não infringem os dispositivos da Lei n.° 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 13 de dezembro de 2019.

Assinatura Mariela Thim Vitorino

Nome do(a) autor(a): **Mariela Thim Vitorino**

RG n.° 46.306.354-5

Assinatura : Silveira

Nome do(a) orientador(a): **Wanderley Dias da Silveira**

RG n.° 8550355-1

9.2.Declaração a Bioética e Biossegurança

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br

DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "***ANÁLISE DA AÇÃO DO SISTEMA LISINA DESCARBOXILASE EM UMA LINHAGEM DE ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICA PARA AVES (APEC) CAUSADORA DE SÍNDROME DE CABEÇA INCHADA***", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura Mariela Thim Vitorino
Nome do(a) autor(a): **Mariela Thim Vitorino**
RG n.° 46.306.354-5

Assinatura : Silveira
Nome do(a) orientador(a): **Wanderley Dias da Silveira**
RG n.° 8550355-1

Data: 13/12/2019