

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

**Abordagem proteômica da interação bactéria-hospedeiro na  
colibacilose aviária**

Dissertação de Mestrado

**Roberta Souza dos Reis**

Porto Alegre, março 2011

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

**Abordagem proteômica da interação bactéria-hospedeiro na  
colibacilose aviária**

Roberta Souza dos Reis

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

Orientação : Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fabiana Horn

Porto Alegre, março 2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Celular, situado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no UNIPROTE-MS do Cbiot-UFRGS e no CME-UFRGS. O trabalho foi parcialmente financiado pelo Projeto MAPA e pelo PPGBCM.

Dedico esse trabalho a minha família e ao meu namorado por todo o companheirismo, bondade e compreensão.

## **Agradecimentos**

Agradeço inicialmente a minha orientadora por todo o suporte oferecido e empenho para a realização desse trabalho.

Aos professores Carlos Termignoni e Marilene Vaistein pelas contribuições ao trabalho e discussões.

Aos funcionários do PPGBCM Silvia Centeno e Luciano Saucedo pela dedicação de sempre.

Aos colegas e ex-colegas do PPGBCM que bastante contribuíram com as suas experiências para este trabalho: Paulo Pinto, Juliana Crestani, Renata Terra, Charley Staats e Adriana Seixas.

Aos colegas de laboratório Nicolle Barbieri, Leticia Matter, Daniel Pavanelo e Aline de Oliveira pelos bons anos de convivência, troca de experiências e apoio.

Ao Departamento de Microbiologia da UFRGS pelo apoio na conclusão desse Mestrado, em especial a colega Leila Ribeiro pelo apoio e compreensão.

Ao UNIPROTE-MS, em especial aos técnicos Jeverson Segalin e agora a Jozi Estanislau pela imensa dedicação para que esse trabalho de realizasse.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS e a todos seus funcionários por terem compartilhado suas experiências comigo e pelo apoio técnico na execução das microscopias.

Finalmente agradeço a minha família e ao meu namorado por todo amor e carinho de sempre.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
Introdução .....	14
1 <i>E. coli</i> patogênica aviária (APEC) .....	15
1.1. Colibacilose aviária: etiologia e patogenia.....	15
1.2 Fatores de virulência associados a APEC .....	18
1.2.1 Adesinas.....	18
1.2.2 Invasinas.....	20
1.2.3 Sideróforos.....	21
1.2.4 Mecanismos de resistência às respostas do hospedeiro .....	22
1.2.5 Toxinas e citotoxinas .....	23
1.2.6 Regulação da virulência de APEC .....	24
1.3 Interação patógeno-hospedeiro na colibacilose aviária.....	25
1.3.1 Novas tecnologias nos estudos da colibacilose aviária.....	27
1.3.1.2 Estudos proteômicos na interação patógeno-hospedeiro .....	27
2 Justificativas do trabalho .....	30
3 Objetivos do trabalho .....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 Materiais e Métodos .....	34
4.1 Linhagens utilizadas e manutenção.....	34
4.2 Linhagem eucariótica utilizada.....	35
4.3 Ensaio de infecção de CEC-32.....	35
4.3.1 Ensaio de associação de APEC a célula-alvo.....	36
4.3.2 Coloração de Giemsa .....	36
4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	36
4.3.4 Ensaio de isolamento de APEC associada à CEC-32.....	37
4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	38
4.5 Lise celular .....	38
4.6 Eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida-SDS.....	39
4.7 Tripsinização em gel .....	39
4.8 Tripsinização em solução .....	40
4.9 Espectrometria de massas e análise de bioinformática .....	40
4.10 Análise estatística .....	41
5 RESULTADOS .....	42
5.1 Viabilidade bacteriana .....	42
5.2 Associação de APEC MT78 a fibroblastos aviários CEC-32 e análise da interação da APEC MT78 por microscopia óptica e eletrônica .....	42
5.3 Padronização da metodologia de preparação da amostra para proteômica .....	47
5.3.1 Preparação de proteínas bacterianas totais.....	47
5.3.2 Recuperação de bactérias associadas à CEC-32 no modelo de co-cultivo ..	50

5.4 Identificação de proteínas importantes na associação de APEC MT78 a CEC-32 por análise proteômica .....	53
6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	70
7 PERSPECTIVAS .....	78
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
<b>CURRICULUM VITÆ resumido.....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Associação de APEC MT78 à fibroblastos CEC-32.....	44
<b>Figura 2.</b>	Características fenotípicas da associação APEC MT78 - CEC-32.....	45
<b>Figura 3.</b>	MEV de fibroblastos CEC-32 infectados com APEC MT78 viável e inativada pelocalor.....	46
<b>Figura 4.</b>	Comparação quantitativa e qualitativa da quantidade de proteína após lises por sonicação, pérolas de vidro ciclo congelamento-descongelamento.....	48
<b>Figura 5.</b>	Microscopia óptica de microscopia eletrônica de varredura de fibroblastos CEC-32 infectados com APEC MT78 MI=200.....	51
<b>Figura 6.</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de APEC MT78 recuperada da interação com CEC-32.....	52
<b>Figura 7.</b>	Representação proporcional dos grupos funcionais das proteínas identificadas.....	67



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relatório das proteínas de APEC MT78 em cultura pura identificadas na preparação de tripsinização *em gel* com 10 fatias.....54
- Tabela 2.** Relatório das proteínas identificadas na preparação de tripsinização em solução de APEC MT78 reisolada da interação de 1h com CEC-32.....59
- Tabela 3.** Relatório das proteínas identificadas na preparação de tripsinização em gel de *E. coli* K12 DH5 $\alpha$ .....62

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>APEC</b>	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
<b>BALT</b>	<i>bronchus-associated lymphoid tissue</i>
<b>Caldo LB</b>	caldo Lúria Bertani
<b>Cbiot</b>	Centro de Biotecnologia da UFRGS
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
<b>DEC</b>	<i>E. coli</i> diarreio gênica
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>D.O.<sub>600</sub></b>	densidade óptica a 600 nanômetros
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EHEC</b>	<i>E. coli</i> enterro-hemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
<b>EPEC</b>	<i>E. coli</i> enteropatogênica
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<b>ExPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
<b>LB-ágar</b>	ágar Luria Bertani
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
<b>mRNA</b>	ácido ribonucléico mensageiro
<b>MET</b>	microscopia eletrônica de transmissão
<b>MEV</b>	microscopia eletrônica de varredura
<b>MI</b>	multiplicidade de infecção
<b>MudPIT</b>	<i>multidimensional protein identification technology</i>
<b>NaIR</b>	resistência ao ácido nalidíxico
<b>NMEC</b>	<i>Escherichia coli</i> causadora da meningite do recém-nascido
<b>PBS</b>	salina tamponada com fosfato
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>SCOTS</b>	<i>selective capture of transcribed sequences</i>

<b>SFB</b>	soro fetal bovino
<b>STM</b>	<i>signature tagged mutagenesis</i>
<b>UFC</b>	unidade formadora de colônia
<b>UPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
<b>VAGs</b>	fatores associados à virulência

## RESUMO

*Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC) causam infecções extraintestinais em frangos conhecidas como colibacilose. A APEC MT78, ao contrário de outras linhagens APEC, foi capaz de invadir células não-fagocitárias no modelo de fibroblastos aviários (CEC-32). Considerando que as interações patógeno-hospedeiro envolvem modificações na abundância de proteínas e padrões de expressão, principalmente nas proteínas de superfície, nosso objetivo foi comparar o proteoma da MT78 crescida em meio de cultura celular com o proteoma de MT78 isolada de fibroblastos aviários infectados (condição de co-cultura). Desenvolvemos aqui a padronização das etapas de extração de proteínas totais, isolamento de células bacterianas do co-cultivo e análise proteômica de modo a obtermos uma análise proteômica global reprodutível e de qualidade.

A análise da interação APEC MT78 e células CEC-32 por microscopia óptica e eletrônica de varredura revelou que essa cepa se associa à célula-alvo em um padrão de adesão localizada. A internalização de APEC MT78 pareceu ocorrer como resultado de uma interação entre bactéria-célula que dispara rearranjos do citoesqueleto de actina da célula-alvo, formando estruturas filo e lamelipodiais que são dependentes da viabilidade bacteriana. O reisolamento de células bacterianas intactas, observadas por microscopia eletrônica de transmissão, após o co-cultivo com CEC-32 foi obtido através da técnica de solubilização diferencial de membranas. As células bacterianas foram sonicadas e as proteínas digeridas em solução seguida de uma etapa de purificação. Nós identificamos 69 proteínas, distribuídas em 9 classes funcionais, incluindo as proteínas de membrana FimA, OmpA and OmpC. A proteína OmpA já foi associada a invasão do patógeno humano NMEC (neonatal meningitis-associated *E. coli*) à células HBMEC.

Esses experimentos representam a primeira investigação proteômica global em *E. coli* patogênica aviária. As proteínas identificadas representaram diferentes rotas metabólicas, funções fisiológicas e diferentes localizações subcelulares.

**Unitermos:** APEC, interação patógeno-hospedeiro, análise proteômica global

## ABSTRACT

In poultry, Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) cause localized extra-intestinal infections that often become systemic. APEC strain MT78 was able to invade non-phagocytic avian fibroblasts *in vitro*, raising the possibility that some APEC strains may invade epithelial cells and gain systemic access. Using light microscopy and scanning electron microscopy, we observed that viable MT78 strain associated with CEC-32 fibroblasts cells in clusters, and following association, MT78 internalization appeared to result from cytoskeleton rearrangements, such as filopodia and lamellipodia, in the eukaryotic membrane. Considering that host-pathogen interactions involve modifications of protein abundance and expression, mainly in surface proteins, we compared the proteome of MT78 harvested from culture medium with the proteome of MT78 isolated from infected avian fibroblasts (co-culture condition).

For this purpose, we developed standard analytical procedures for global protein extraction and isolation of bacterial cells from infected CEC-32. Judged by transmission electron microscopy, we successfully reisolated intact APEC MT78 cells from CEC-32 fibroblasts using the differential membrane solubilization method. Bacterial cells were then sonicated and proteins digested *in solution* following a *clean up* procedure. We identified 69 proteins, distributed in 9 functional classes, including the membrane proteins FimA, OmpA and OmpC. The OmpA protein was already associated to invasion of the human pathogen called NMEC (neonatal meningitis-associated *E. coli*) to endothelial cell line HBMEC.

Our results represent the first global proteomic investigation in APEC. The proteome of MT78 infecting avian fibroblasts may allow us to identify key proteins linked to the successful adhesion and/or invasion of host cells by APEC and thus throw light into the pathogenesis of avian colibacillosis.

Key-words: APEC, host-pathogen interaction, global proteomic analysis

## INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é um microrganismo bastante notável pela sua versatilidade genética. Anaeróbio facultativo majoritário da microbiota intestinal de mamíferos e outros animais de sangue quente, essa bactéria coexiste com seu hospedeiro de maneira mutuamente benéfica e raramente causa doença, com a exceção de hospedeiros imunocomprometidos ou quando há o rompimento da barreira intestinal. Porém, esse comensal inofensivo pode adquirir uma combinação de elementos genéticos móveis para tornar-se um patógeno adaptado ao seu hospedeiro e capaz de causar uma enormidade de patologias em indivíduos saudáveis, que variam de gastroenterites a infecções extraintestinais, como infecções do sistema nervoso central (KAPER *et al.*, 2004).

Isolados de *E. coli* tanto de animais quanto de humanos foram associados a doenças. Atualmente, nove patotipos de *E. coli* são conhecidos e seus mecanismos patogênicos extensivamente estudados. Os nove patotipos ainda podem ser mais amplamente agrupados, de acordo com critérios genéticos e clínicos, em *E. coli* diarréicas (DEC) ou *E. coli* extraintestinais (ExPEC). Seis patotipos são diarréicos: (1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), (2) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e (3) *E. coli* difusamente aderente (DAEC), que colonizam o intestino delgado e causa diarreia; (4) *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) e (5) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), que causam doença no intestino grosso; e a (6) *E. coli* enteroagregativa, que pode colonizar e causar doença em ambos os intestinos. Três patotipos são extraintestinais: (1) *E. coli* uropatogênica (UPEC), que penetra no trato urinário e invade o epitélio da bexiga causando cistite, e quando mal tratada pode ascender aos rins e causar pielonefrite e septicemia; (2) *E. coli* causadora da meningite neonatal (NMEC), que atravessa a barreira hematoencefálica e coloniza o sistema nervoso central causando meningite; e finalmente (3) *E. coli* patogênica aviária (APEC), que causa a colibacilose aviária (RUSSO & JOHNSON, 2000; KAPER *et al.*, 2004; CROXEN & FINLAY, 2010). Linhagens que são diarréicas, via de regra, não causam doenças extraintestinais, e aquelas linhagens que causam doenças extraintestinais normalmente não causam diarreia (RUSSO & JOHNSON, 2003). *E. coli* patogênicas compartilham estratégias de virulência que basicamente consistem em

aderir e eventualmente invadir a célula hospedeira, evadir das defesas do hospedeiro, sinalizar e interferir diretamente nas funções celulares do hospedeiro via toxinas ou proteínas secretadas, por fim multiplicar-se e colonizar o hospedeiro levando à doença (CROXEN & FINLAY, 2010). Embora frequentemente tenham os mesmos alvos no hospedeiro, cada patotipo tem seu próprio mecanismo molecular característico para aderir e explorar a célula hospedeira, levando a sintomas clínicos particulares a cada patotipo. O que faz cada patotipo ser diferente é o conjunto de genes envolvidos no sequestro de maquinarias e processos celulares do hospedeiro e na subversão das suas respostas (CROXEN & FINLAY, 2010).

RODRIGUEZ-SIEK *et al.* (2005b) estudaram 451 isolados de APEC e verificaram que a maioria das cepas compartilhavam genes de virulência com cepas ExPEC humanas. Outro estudo comparou 524 isolados de APEC com 200 isolados de UPEC (*E. coli* uropatogênica) e demonstrou que os dois grupos estudados apresentam similaridades consideráveis entre os seus sorogrupos e genótipos de virulência (RODRIGUEZ-SIEK *et al.*, 2005a). Muitos dos fatores de virulência presentes em APEC também estão presentes em cepas humanas de ExPEC que causam meningite (SCHOULER *et al.*, 2004). Então, RON (2006) sugeriu que cepas de APEC são patógenos zoonóticos, corroborando com as especulações de que cepas APEC poderiam infectar humanos, enquanto aves atuariam como reservatório. A rota fecal-oral é o meio possível pelo qual cepas de *E. coli* uropatogênicas alcançariam o intestino humano.

Portanto, enquanto os patotipos de *E. coli* entéricos podem ser definidos pelos fatores de virulência que apresentam ou o sorogrupo a qual pertencem, as ExPEC compartilham vários fatores associados à virulência (VAG's), e até o momento não está estabelecido que fatores definem uma ExPEC ou distinguem uma de outra.

## **1 *E. coli* patogênica aviária (APEC)**

### **1.1. Colibacilose aviária: etiologia e patogenia**

APEC está associada com infecções extra-intestinais, chamadas colibacilose

aviária, em frangos, pavões, patos e outras espécies de aves. A colibacilose aviária é responsável por perdas econômicas significativas na indústria aviária em todo o mundo. No Brasil, a produção de carne de frango no ano de 2009 atingiu a marca de 11 milhões de toneladas, sendo que 70% abastece o mercado interno (AviSite, 2011). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil é o 3º maior produtor de carne de frango e ocupa a posição de líder mundial em exportação, exportando atualmente para 142 países. A expectativa do MAPA é de que até o ano de 2020 o Brasil detenha 48,1% das exportações mundiais de carne de frango. A produção de carne de frango tem destaque na região sul do país, onde o Rio Grande do Sul e o Paraná são os principais estados fornecedores (MAPA, 2011). As condições de confinamento em que as aves são mantidas nos grandes criadouros, como altas temperaturas, pouca ventilação, alto nível de amônia no ambiente e a presença de micotoxinas na ração, favorecem a ocorrência de infecções por APEC. Infecções por outras bactérias ou vírus, tais como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pneumovirus*, vírus da Bronquite Infecciosa, doença de Marek e de New Castle, também podem deixar a ave pré-disposta à infecção por APEC. De modo geral, qualquer fator que possa lesionar o epitélio respiratório, inclusive vacinas com vírus atenuado, pode tornar a ave mais suscetível à doença. No entanto, a presença dos fatores predisponentes por muito tempo levou à crença de que a doença resultaria de uma infecção oportunista que dependia apenas da suscetibilidade do hospedeiro, subestimando a virulência de APEC (revisado em DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; RON, 2006; DZIVA & STEVENS, 2008).

Dependendo da virulência da cepa, estado imunológico do hospedeiro e as condições de confinamento, a infecção por APEC inicia com a infecção respiratória (aerosaculite), que pode evoluir para uma septicemia que, se não tratada, pode causar a morte súbita da ave ou infecção em múltiplos órgãos. Consequentemente, as manifestações clínicas de APEC causam à diminuição da produtividade e/ou a condenação de carcaças no abatedouro (revisado em DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; DZIVA & STEVENS, 2008).

Após a inalação de poeira contaminada, os sacos aéreos e a região de trocas



gasosas no pulmão são as portas de entrada de APEC na circulação das aves (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; MELLATA, *et al.* 2003). Na ave, essa região é altamente vascularizada e consiste essencialmente do endotélio, de uma lamina basal simples e de uma camada muito fina de células epiteliais escamosas. O epitélio de trocas gasosas em aves é bem mais fino e de superfície muito maior quando comparado à região de trocas gasosas nos mamíferos. Essas duas características estruturais do epitélio de trocas gasosas das aves aumentam a eficiência respiratória, porém expõem seu tecido pulmonar a riscos, como injúrias e invasão por microrganismos patogênicos. Estruturas linfóides organizadas na mucosa brônquica são encontradas no pulmão de aves e assemelham-se a placas de Peyer<sup>1</sup> de mamíferos. Essas estruturas, designadas BALT, contêm macrófagos, células com morfologia dendrítica e heterófilos, e gradualmente desenvolvem-se em estruturas maduras nas aves de 6 a 8 semanas de idade (REESE *et al.*, 2006). Portanto, a primeira linha de defesa das aves é o influxo inflamatório rápido de heterófilos seguido de macrófagos ao sítio de infecção. Além do influxo inflamatório dos sacos aéreos, a hipervascularização ocorre rapidamente após uma infecção, o que supostamente colabora para a passagem da bactéria pelo interstício do epitélio dos sacos aéreos ao sistema vascular, causando bacteremia.

Para estabelecer a colisepticemia, APEC deve aderir ao epitélio respiratório de aves, evadir das células de defesa e resistir aos efeitos do soro. A presença de bactérias na corrente sanguínea pode ser observada 48 h após a infecção, embora o quadro de septicemia aguda possa se instalar nas primeiras seis horas, levando as aves à morte na ausência de lesões. As aves sobreviventes ao quadro de septicemia podem apresentar algumas lesões menos frequentes, que incluem: salpingite (infecção do oviduto), meningoencefalite, celulite, osteomielite e sinovite, esplenomegalia, fígado com coloração esverdeada e congestão do tecido muscular (FERREIRA & KNÖBL, 2000).

---

<sup>1</sup> Placas de Peyer são tecidos linfóides localizados no intestino humano e são recobertos na sua face luminal pelo epitélio associado ao folículo (FAE). Esse epitélio é recoberto por células M (células Microfold).

## 1.2 Fatores de virulência associados a APEC

Vários fatores de virulência foram identificados em APEC, como adesinas fimbriais, sistemas sideróforos, proteínas de resistência ao soro e a presença do plasmídeo de Colicina V, e o estudo do envolvimento desses fatores na virulência tanto em modelo animal quanto em modelos *in vitro* têm pouco mais de 10 anos. Curiosamente, não há uma associação clara entre a combinação dos VAG's e a habilidade de causar infecções sistêmicas por uma determinada cepa, tampouco um único fator de virulência que responda inteiramente pela doença.

### 1.2.1 Adesinas

As adesinas estão envolvidas na primeira etapa da infecção, permitindo o primeiro e íntimo contato do patógeno com seu hospedeiro e podem iniciar uma cascata patogênica. Nem todas as adesinas são essencialmente fatores de virulência e suas atribuições nas doenças bacterianas têm sido particularmente difíceis de definir, visto que a bactéria pode expressar diversas adesinas ao longo do curso da infecção. Como já mencionado, acredita-se que a rota primária de infecção por APEC seja o epitélio do trato respiratório das aves, enquanto o trato intestinal das aves seria um reservatório para cepas patogênicas e não-patogênicas (EWERS *et al.*, 2009). Além disso, cepas APEC podem colonizar vários órgãos nas aves que sobrevivem à septicemia. Na colibacilose aviária a expressão diferencial de várias adesinas também parece ser utilizada pela bactéria durante a patogênese (POURBAKHSI *et al.*, 1997; revisado em DZIVA & STEVENS, 2008; ANTÃO *et al.*, 2009).

As propriedades adesivas de APEC são principalmente mediadas pelas fímbrias do tipo 1. A função da fímbria do tipo 1 na colibacilose aviária está associada com a adesão e colonização da mucosa traqueal e do trato intestinal das aves (MULVEY *et al.*, 1998). Nove genes, localizados no operon *fim*, são necessários para sua síntese. A fímbria do tipo 1 consiste de polímeros de subunidades protéicas, em que a proteína majoritária FimA está associada a proteínas estruturais da fímbria, FimF e FimG. A adesina propriamente dita é a proteína FimH, que está localizada na extremidade da

fímbria e reconhece resíduos de D-manose, ligando a fímbria a receptores da célula hospedeira, glicoproteínas da matriz extracelular e a mucinas (RUSSO & JOHNSON, 2002). O fato das fímbrias estarem presentes também em cepas não-patogênicas tornaria questionável o papel das fímbrias do tipo 1 na virulência de APEC (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; FERREIRA & KNÖBL, 2000). Contudo, apesar da ubiquidade de *fim*, existem diferenças significativas entre isolados clínicos de diferentes síndromes, e entre patógenos e comensais, com respeito à variação de fase na regulação desse operon e à especificidade do receptor da adesina FimH (revisado em RUSSO & JOHNSON, 2002).

Além da já bem conhecida fímbria do tipo 1, a fímbria P de APEC também exerce função na colonização da bactéria a diversos órgãos da ave infectada (POURBAKHSH *et al.*, 1997a). APEC que expressam fímbrias do tipo 1 aderem preferencialmente a traquéia e sacos aéreos da ave, enquanto que *E. coli* que expressam fímbria P são importantes para a colonização de órgãos internos em estágios mais avançados da doença (POURBAKHSK *et al.*, 1997a). Adesinas fimbriais P, que consistem de uma subunidade principal PapA e da adesina papG localizada na extremidade da fímbria, foram inicialmente encontradas em *E. coli* uropatogênicas e estão associadas à adesão bacteriana ao epitélio urinário humano, sendo determinantes no desenvolvimento da pielonefrite (DOBRINDT & HACKER, 2008).

Outras adesinas não-fimbriais, como o curli e hemaglutinina sensível a temperatura (Tsh), já foram relacionados com a patogênese de APEC, porém suas funções ainda necessitam ser elucidadas. Curli são estruturas superficiais filamentosas e espiraladas cujo gene, *csgA*, é encontrado na maioria das cepas de *E. coli* e *Salmonella*. Sua relação com a patogênese é deduzida a partir da sua habilidade de mediar a ligação da bactéria a componentes da matriz extracelular, como fibronectina e laminina. Além de adesina, demonstrou-se que o curli exerce uma função importante na invasão da bactéria a células eucarióticas (GOPHNA *et al.*, 2001). Já a Tsh, uma proteína autotransportadora, tem função sugerida nas primeiras etapas da patogênese por contribuir na adesão aos sacos aéreos e no desenvolvimento da aerossaculite (DOZOIS *et al.*, 2000).

### 1.2.2 Invasinas

Muitos patógenos são capazes de entrar e sobreviver dentro de células eucarióticas. Alguns microrganismos induzem mudanças profundas tanto na sua própria célula como na célula aderida, sendo capazes de induzir sua própria internalização em células hospedeiras que não fagocitárias, como células epiteliais adjacentes a superfícies mucosas e células endoteliais adjacentes a vasos sanguíneos. A invasão pode prover um meio para que o microrganismo consiga romper a barreira epitelial do hospedeiro. Presume-se que táticas de invasão asseguram um nicho para que a bactéria sobreviva e se multiplique. Geralmente os mecanismos de invasão envolvem proteínas efetoras, também chamadas invasinas, que são sintetizadas pela bactéria e mimetizam ligantes proteicos reconhecidos pela célula hospedeira. Essas proteínas efetoras modificam o citoesqueleto celular de maneira coordenada e permitem a invasão bacteriana subsequente (WILSON *et al.*, 2002). Alternativamente, alguns microrganismos são fagocitados por células fagocitárias, tais como macrófagos. Patógenos que sobrevivem e se multiplicam dentro de células fagocitárias possuem mecanismos que favorecem sua sobrevivência (FINLAY & FALKOW, 1997). Ainda não está claro como APEC alcança a corrente sanguínea das aves infectadas. Um estudo realizado por MELLATA e colaboradores demonstrou que APEC pode sobreviver no interior de macrófagos primários por até 48 h (2003). POURBAKHSH e colaboradores (1997c) demonstraram, em estudos *in vivo*, que APEC é capaz de penetrar no epitélio de sacos aéreos após a inalação da bactéria. Estudos mais recentes mostram a habilidade de uma cepa APEC (MT78) invadir células não fagocitárias (GERMON *et al.*, 2005; CHANTELOUP *et al.*, 2010; MATTER *et al.*, 2010). Portanto ou a bactéria entra na corrente sanguínea após a sua internalização em macrófagos (mecanismo cavalo de tróia) ou ela invade diretamente o epitélio - danificado ou não - de sacos aéreos e pulmão.

No caso da ExPEC humana NMEC, a penetração da barreira hemato-encefálica está relacionada, entre outros fatores, com o produto do gene *ibeA*, localizado na ilha de patogenicidade *gimA*. GERMON e colaboradores (2005) demonstram que IbeA tem relação com a invasão de uma cepa APEC a células endoteliais humanas da linhagem de células do endotélio microvascular de cérebro humano (HBMEC). No entanto, o

gene *ibeA* apresenta uma frequência de cerca de 20% em APEC isoladas de aves acometidas pela colibacilose (EWERS *et al.*, 2007; BARBIERI *et al.*, manuscrito em preparação). Outra invasina em potencial encontrada em APEC é o gene *tia*, localizado na ilha de patogenicidade 1, que carrega também o operon *pap*. Essa invasina é homóloga à proteína Tia de *E. coli* enterotoxigênica, que influencia a adesão e a invasão dessa bactéria a linhagens celulares humanas ileocecal e células do epitélio colônico (revisado em DZIVA & STEVENS, 2008).

### 1.2.3 Sideróforos

A baixa concentração de ferro livre nos fluidos dos tecidos animais não é suficiente para permitir a multiplicação bacteriana. Assim, bactérias que se multiplicam em condições de restrição de ferro normalmente apresentam sistemas de captação de ferro, que compreendem um composto capaz de se ligar ao ferro (chamado sideróforo) e proteínas da membrana externa, que atuam como receptor do sideróforo quando ele está ligado ao ferro. A habilidade de patógenos em sequestrar ferro dos fluidos corporais através da produção de sideróforos é considerada essencial para virulência. Os sideróforos atuam como quelantes de íon no hospedeiro e competem com as proteínas ligantes de ferro do hospedeiro. Dentre os sistemas estudados em patógenos Gram negativos, o sistema da aerobactina é o melhor caracterizado. A aerobactina é sintetizada pelos produtos gênicos codificados no operon *iucABCD*, e a captação do complexo aerobactina -  $\text{Fe}^{3+}$  ocorre via uma proteína de membrana externa codificada pelo gene *iutA*, com alta afinidade por  $\text{Fe}^{3+}$  (revisado em DZIVA & STVENS, 2008; CHOIKHA 2008). O operon da aerobactina geralmente é carregado em plasmídeos grandes, como o plasmídeo da colicina V, cuja presença também é relacionada com a virulência em APEC (revisado em DHO MOULIN & FAIRBROTHER, 1999).

O sistema de aquisição de ferro salmoquelinas são produzidas por *Salmonella enterica* e algumas cepas de ExPEC. Esse sistema compreende dois conjuntos de genes: *iroBCDE* e *iroN*. O gene *iroB* codifica uma glicosiltransferase que glicosila a enterobactina; *iroC* codifica um transportador do tipo ABC necessário para o transporte de salmoquelinas; *iroD*, *iroE* e *iroN* codificam respectivamente uma esterase

citoplasmática, uma hidrolase periplásmica e um receptor sideróforo de membrana externa (CAZA *et al.* 2008).

Um sistema homólogo ao *sitABCDE* de *Salmonella enterica* foi identificado na cepa APEC  $\chi$ 7122 (SABRI *et al.* 2006). Nessa cepa, o *sitABCDE* é um sistema transportador de ferro e manganês que, em combinação com outros sistemas de captação de ferro, pode contribuir para a aquisição de ferro e sobrevivência bacteriana ao estresse oxidativo.

#### 1.2.4 Mecanismos de resistência às respostas do hospedeiro

A resistência aos efeitos bactericidas do soro, como a lise mediada pelo complemento e a opsonização, é importante na virulência de APEC, principalmente para aquelas cepas isoladas de aves septicêmicas. Essa resistência é mediada por estruturas na superfície bacteriana, tais como LPS, cápsula e proteínas de membrana externa. Alguns polissacarídeos da cápsula são capazes de interagir com moléculas C3 e C3b nas rotas clássica e alternativa do complemento. Além disso, o antígeno K1 presente na cápsula, que está associado a cepas APEC dos sorogrupos O1 e O2, previne a ação da rota alternativa do sistema complemento em NMEC (revisado por DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; DZIVA & STEVENS, 2008). Porém, POURBAKHSI e colaboradores (1997b) demonstraram que três cepas APEC que expressavam cápsula K1 eram mais resistentes aos efeitos bactericidas do soro do que cepas APEC que expressavam outros antígenos K.

A maioria das cepas APEC possuem o plasmídeo para colicina V (ColV). Esses plasmídeos também contêm outros genes relacionados à patogenicidade e à sua perda e/ou mutações estão relacionadas à diminuição da virulência de APEC (SKYBERG *et al.* 2008; MELLATA *et al.*, 2010). A região do plasmídeo ColV que carrega os genes *traT* e *iss* foi a primeira região a ser relacionada com a resistência ao soro e virulência. Esses genes codificam proteínas de membrana externa e acredita-se que previnam a deposição do complexo de ataque à membrana do sistema complemento. TraT também está relacionada com o impedimento da deposição de C3 na membrana bacteriana, exercendo assim uma função de inibidor da fagocitose (revisado por DZIVA &

STEVENS *et al.*, 2008). O antígeno K1 também é capaz de evitar a associação com macrófagos simplesmente pela sua natureza hidrofóbica e carga negativa. Bactérias que expressam fímbria P podem evitar a fagocitose pelos efeitos repulsivos que a fímbria provoca devido a suas propriedades eletrostáticas ou devido à falta de receptores de glicolípídeos na membrana dos fagócitos. De fato, MELLATA e colaboradores (2003) mostraram que cepas mutantes para o antígeno K1 ou *papG* associam mais a macrófagos do que as respectivas cepas selvagens, enquanto que mutantes para fímbria Tipo 1 associam menos, atribuindo a essa adesina mais uma função na virulência de APEC.

Já foi demonstrado que cepas APEC, além da provável atividade anti-fagocitária, também são capazes de interagir com macrófagos *in vivo* e estavam presentes dentro de macrófagos nos sacos aéreos e pulmão da ave infectada (POURBAKHSI *et al.*, 1997c). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que algumas cepas APEC (MT78, por exemplo) se associam mais a macrófagos do que outras cepas APEC ( $\chi$ 7122 e TK3, por exemplo) (MELLATA *et al.*, 2003).

Baseado nos diferentes padrões de interação de APEC com macrófagos pode-se inferir, portanto, que, o comportamento dessas cepas frente aos fagócitos pode depender não só da natureza da cepa, mas também do estágio da infecção. A maior associação com as células fagocitárias seria requerida nos primeiros estágios da infecção, enquanto a fímbria Tipo 1 estaria sendo expressa na colonização dos sacos aéreos e pulmões; cabe lembrar que a expressão da fímbria tipo 1 favorece a sobrevivência da bactéria internalizada no macrófago (BAORTO *et al.*, 1997). Já nos estágios mais avançados da doença, como na disseminação na corrente sanguínea e colonização de outros órgãos, APEC evitaria a interação com os fagócitos.

### 1.2.5 Toxinas e citotoxinas

Patógenos podem produzir substâncias que são tóxicas direta ou indiretamente para as células do seu hospedeiro ou a outras bactérias, como no caso das colicinas. Colicinas são proteínas expressas por *E. coli* que inibem a multiplicação de bactérias da mesma espécie ou de espécies relacionadas. As colicinas são compostas de duas

subunidades: uma que provoca lesões na célula bacteriana e outra que protege a bactéria contra suas próprias colicinas. Essas proteínas podem ser codificadas por genes localizados em plasmídeos grandes, sendo frequentemente chamados de plasmídeos Col. Os plasmídeos Col mais prevalentes em APEC são os que codificam genes para as colicinas Ia, Ib, E1, E2, E3, I, K, B e V. Algumas poucas toxinas já foram relatadas para cepas APEC, porém as suas funções na patogenicidade são ainda obscuras, como a enterohemolisina, CNF-1, verotoxinas e toxina Shiga (revisado em DZIVA & STEVENS, 2008). PARREIRA & GYLES (2003) descreveram uma toxina vacuolizante expressa por uma cepa APEC, codificada pelo gene *vat* que induz a formação de vacúolos intracelulares, resultando em um efeito citotóxico similar aos efeitos causados pela toxina *VacA* de *Helicobacter pylori*. Essa toxina foi posteriormente encontrada em outras cepas APEC (EWERS *et al.*, 2004; EWERS *et al.*, 2005; BARBIERI *et al.*, manuscrito em preparação).

### 1.2.6 Regulação da virulência de APEC

Existe uma rede regulatória complexa em *E. coli* que a leva da adesão e colonização do hospedeiro até a invasão sistêmica. De alguma maneira a bactéria percebe o ambiente, adaptando-se rapidamente e alterando a expressão de genes que são necessários em cada etapa do processo infeccioso. Conseqüentemente ocorrem mudanças das estruturas de superfície e metabolismo adaptativo da bactéria. Além dos determinantes de virulência linhagem-específicos, é sabido que a virulência pode ser regulada por sistemas globais conservados. Enquanto muitos genes envolvidos na virulência de APEC já foram identificados, a regulação da virulência, incluindo a de grandes plasmídeos de virulência, apenas começou a ser elucidada. HERREN e colaboradores (2006) demonstraram que o sistema de dois componentes BarA-UvrY controla a virulência em APEC afetando negativamente a expressão das fímbrias Tipo 1 e P. Nesse estudo, observou-se o comprometimento da virulência de mutantes *barA*<sup>-</sup> e *uvrY*<sup>-</sup> em uma combinação de determinantes, tais como a habilidade de aderir, invadir e sobreviver dentro de macrófagos aviários (HD11) e fibroblastos aviários (DF-1). Ainda não está claro se essa regulação é direta, indireta, ou ambas.



Em um estudo mais recente com a cepa APEC SEPT362, foi descrito que os genes do sistema de secreção do tipo 6 (SST6) *hcp* e *clpV* influenciaram especificamente a expressão da fímbria do Tipo 1, estão envolvidos na adesão e invasão a células HeLa e são importantes na patogenicidade em modelo *in vivo* (de PACE *et al.*, 2010). Em conjunto, esses dados sugerem uma função importante do SST6 na patogênese da colibacilose aviária.

### 1.3 Interação patógeno-hospedeiro na colibacilose aviária

Estudos de interação patógeno-hospedeiro nas últimas décadas permitiram que muitos dos fatores associados à virulência de *E. coli* patogênicas tenham sido elucidados, fornecendo uma melhor compreensão no nível molecular de como esses fatores contribuem para o surgimento da doença (revisado em CROXEN & FINLAY, 2009). Na colibacilose aviária, embora vários estudos venham sendo conduzidos no esforço de identificar VAG's de APEC e suas funções em potencial, poucos são os estudos que têm revelado o papel real desses genes na interação APEC-hospedeiro. Isso é em parte devido à falta de bons modelos disponíveis para estudar essas interações no nível celular e molecular.

Já é sabido que APEC são internalizadas e sobrevivem dentro de células fagocitárias (MELLATA *et al.*, 2003). POURBAKHSH e colaboradores (1997c) foram pioneiros ao demonstrar *in vivo* que uma cepa patogênica de APEC pode invadir células do epitélio de sacos aéreos, sugerindo que a invasão de células não fagocitárias pode ser uma estratégia de virulência de APEC. De fato, dados de alguns investigadores demonstram que APEC é capaz de invadir linhagens de células humanas, tais como a Hep (carcinoma epidermóide humano), HeLa (cérvice humano), HBMEC (células endoteliais) e A549 (células de pneumócitos humano) (LA RAGIONE *et al.*, 2000; GOPHNA *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2002; GERMON *et al.*, 2005; CHANTELOUP *et al.*, 2010). Células primárias de origem aviária e explantes de tecidos também já foram utilizadas na mesma abordagem (LA RAGIONE *et al.*, 2000; MELLATA *et al.*, 2003; RAMIREZ *et al.*, 2009). Esse modelo conferiria várias vantagens sobre linhagens imortalizadas nos estudos de interação APEC-célula

hospedeira, já que mimetizaria o ambiente encontrado pela bactéria *in vivo*. Porém, estudos com células primárias têm como desvantagem a dificuldade de obtenção e manipulação.

Recentemente, linhagens de hepatócitos aviários (CHANTELOUP *et al.*, 2010) bem como fibroblastos aviários DF-1 (HERREN *et al.*, 2006) e CEC-32 (MATTER *et al.*, 2010) têm sido utilizadas nos estudos de patogênese da colibacilose aviária. CHANTELOUP e colaboradores (2010) demonstraram que a cepa BEN2908, derivado resistente ao ácido nalidíxico da cepa MT78, é capaz de aderir e invadir pneumócitos humanos (linhagem A549) e hepatócitos de aves (LMH), indicando que não há uma especificidade absoluta pela célula hospedeira. Porém, apesar de aderir com a mesma eficiência às duas linhagens celulares, a bactéria invade os hepatócitos aviários com maior eficiência. Novamente a fímbria Tipo 1 mostrou ter um papel essencial na adesão e invasão, mas não fundamental, sugerindo que outros componentes minoritários estão envolvidos no fenômeno. Fazendo uso de inibidores específicos, o grupo ainda mostrou que a internalização da bactéria é dependente da via endocítica da clatrina e de polimerização da actina do citoesqueleto celular.

Em um estudo realizado pelo nosso grupo, foi investigado a interação de 8 cepas APEC já caracterizadas por outros grupos (UEL31, UEL17, UEL13, UEL29, MT78, IMT5155, IMT2470, A2363) com a linhagem de fibroblastos de galinha CEC-32 quanto ao perfil de associação (adesão + invasão) e capacidade de invasão. Uma cepa, APEC MT78, destacou-se quanto à capacidade de invasão na célula não fagocitária, invadindo a níveis comparáveis ao de *Salmonella typhimurium*, patógeno sabidamente invasivo. Já que APEC MT78 é capaz de invadir fibroblastos de galinha, novamente esse estudo reforça a ideia de que algumas cepas APEC, após a colonização do epitélio respiratório, seriam capazes de provocar sua internalização pelas células desse tecido. O estudo ainda sugere a linhagem CEC-32 como um bom modelo experimental para o estudo dos mecanismos celulares e moleculares pelos quais APEC invadem células não-fagocitárias.

### 1.3.1 Novas tecnologias nos estudos da colibacilose aviária

A determinação de genes bacterianos que são expressos durante a infecção ou que são essenciais para a virulência no hospedeiro pode prover informações valiosas para prevenir e controlar doenças infecciosas. Recentemente, a identificação da expressão *in vivo* de genes bacterianos importantes na virulência está sendo observada em diferentes abordagens. Um método bastante comum é a mutagênese por transposon marcado por assinatura (STM) (revisado em DZIVA & STEVENS, 2008). LI e colaboradores (2005) utilizaram esse método e identificaram 28 genes de APEC necessários para estabelecer a colissepticemia em galinhas após a inoculação intratraqueal, incluindo dois genes que codificam transportadores de ferro nunca antes caracterizados em APEC. DOZOIS e colaboradores (2003) observaram, por meio do sequenciamento de cDNAs obtidos da seleção de sequências transcritas específicas do patógeno (SCOTS), que transcritos relacionados com adesinas, síntese do LPS, sistemas de aquisição de ferro, sequências de plasmídeos e fagos foram expressos pela APEC  $\chi$ 7122 nos tecidos durante a infecção experimental de galinhas.

Em 2007, foi disponibilizada a primeira sequência do genoma de uma cepa APEC (JOHNSON *et al.*, 2007), a APEC O1. Isso tornou possível o emprego de abordagens alternativas baseadas no genoma, como por exemplo a predição *in silico* de novos *loci* de virulência e estudos proteômicos.

#### 1.3.1.2 Estudos proteômicos na interação patógeno-hospedeiro

As interações entre patógeno-hospedeiro envolvem modificações na expressão de proteínas tanto do hospedeiro quanto no patógeno, e o entendimento desses eventos colabora na elucidação dos mecanismos patogênicos de microrganismos.

Alguns patógenos podem modificar seu próprio metabolismo ou proteoma para adaptar-se à célula hospedeira, dessa maneira aumentando a virulência ou induzindo um estado latente dentro da célula infectada para permanecer despercebido pelo sistema imunológico do hospedeiro (revisado em COIRAS *et al.*, 2008). A identificação de proteínas de patógenos, particularmente fatores de virulência e toxinas, pode ser realizada ao contrapor cepas virulentas e não virulentas, mutantes, nocautes, etc. No

entanto, em um modelo de interação, o proteoma do patógeno pode ser sobrepujado pelo proteoma do hospedeiro, visto que há uma grande diferença entre os tamanhos de proteomas (revisado em COIRAS *et al.*, 2008). Para superar esse inconveniente, modelos de estudos “livres do hospedeiro” (“*host-free*”) vêm sendo bastante utilizados na análise proteômica de patógenos, normalmente crescendo o microrganismo sob condições fisiológicas que mimetizam a interação com o hospedeiro (ADKINS *et al.* 2006; BAE *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2007; GODOY *et al.*, 2008; TYLER *et al.*, 2008, CONGLI *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2009). Outra estratégia empregada com sucesso é a separação prévia do extrato protéico em eletroforese em gel unidimensional (GODOY *et al.*, 2008; CONGLI *et al.*, 2009) ou bidimensional, seguida da digestão em gel para identificação das proteínas. A abordagem com gel bidimensional tem sido utilizada com sucesso (AL DAHOUK *et al.*, 2008; FUGIER *et al.*, 2009) em modelos nos quais procura-se por proteínas específicas e/ou quando a quantidade da amostra não é um fator limitante. Quando a amostra é limitada, devido à multiplicação do microrganismo ou procedimento de extração, e/ou o objetivo é uma análise em larga escala, uma boa alternativa são as preparações nas quais a digestão proteica ocorre em solução (MOTTAZ-BREWER *et al.*, 2008). A aplicação de técnicas de análise proteômica em larga-escala na interação patógeno-hospedeiro já foi realizada na identificação de proteínas de *Salmonella typhimurium*. SHI e colaboradores (2006), utilizando a abordagem de separação do extrato proteico por cromatografia líquida multidimensional seguida de espectrometria de massas (*Multidimensional protein identification technology- MudPIT*), identificaram proteínas bacterianas que contribuem para a multiplicação do patógeno dentro de macrófagos murinos. Em uma abordagem similar, ainda é possível identificar proteínas da célula hospedeira, para se compreender como a célula hospedeira responde à infecção bacteriana, como já demonstrado pelo mesmo grupo (SHI *et al.*, 2009). Outra alternativa em análises proteômicas seria resolver as proteínas bacterianas em gel bidimensional e transferi-las para uma membrana que é então colocada em contato com anti-soro do hospedeiro. Proteínas que reagissem com o anti-soro do hospedeiro poderiam ser eluídas da membrana e identificadas por espectrometria de massas. Essa técnica de imunoproteômica permite identificar proteínas com potencial imunodiagnóstico ou vacinal e

vem sendo utilizada com sucesso para diversos patógenos (revisado em DZIVA & STEVENS, 2008).

TYLER e colaboradores (2007), usando uma abordagem proteômica com gel bidimensional, identificaram a expressão diferencial de proteínas de membrana externa, OmpA e OmpC, de APEC em resposta a exposição ao soro de galinha. Esses resultados apontam que OmpA de APEC está relacionada também com a resistência ao soro, de maneira similar ao já descrito para NMEC (revisado em KIM, 2003).

O presente trabalho propõe a utilização da proteômica como ferramenta para identificar proteínas de APEC essenciais no processo de adesão/invasão dessa bactéria a fibroblastos aviários da linhagem CEC32. A elucidação das proteínas expressas durante a adesão/invasão da bactéria ao hospedeiro permitirá entender melhor a virulência e patogênese APEC através do modelo da APEC MT78.

## 2 JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO

Métodos de cultivo *in vitro* são uma alternativa bastante útil para investigar as interações patógeno-hospedeiro e a função potencial de certos genes na virulência. No entanto, como já mencionado, não existe um consenso sobre as linhagens celulares utilizadas nos estudos, o que torna difícil a interpretação de resultados produzidos por diferentes laboratórios. MATTER e colaboradores (2010) propuseram o modelo de fibroblastos CEC-32, na ausência de linhagens aviárias epiteliais, como um bom modelo para investigar as primeiras etapas da patogênese de APEC no nível celular.

Em um primeiro momento, propusemos analisar por microscopia a associação da APEC MT78 às células CEC-32. No nosso entendimento, essa etapa inicial é primordial para secreção de proteínas importantes para a invasão de APEC. No modelo de estudo proposto, a cepa escolhida foi APEC MT78, isolada da traquéia de galinha com colibacilose na França (DHO-MOULIN & LAFONT, 1982); essa cepa causa infecção sistêmica quando inoculada intra-traqueia em galinhas de 5 semanas de idade (HORN *et al.*, manuscrito em preparação) e demonstrou grande capacidade de adesão e invasão em fibroblastos aviários da linhagem CEC32 (MATTER *et al.*, 2010), como mencionado anteriormente. A cepa também é capaz de persistir em macrófagos aviários primários por até 48 h pós-infecção (MELLATA *et al.*, 2003). As estratégias moleculares e celulares utilizadas por MT78 na invasão de células não-fagocitárias poderiam ser deduzidas na identificação dos genes de virulência. No entanto, a cepa MT78 apresenta um genótipo similar, dentre 33 genes associados à virulência de APEC testados (EWERS *et al.*, 2007), a outras cepas não-invasivas (MATTER *et al.*, 2010). Ou os genes de adesinas e invasinas são expressos por MT78 e não expressos em outras cepas, ou os genes que explicam o fenótipo invasivo da MT78 ainda não são conhecidos.

Recentemente, análises proteômicas vêm sendo usadas como uma ferramenta para identificar proteínas-chave na patogênese de diversos patógenos (DJORDJEVIC *et al.*, 2004; CULLEN *et al.*, 2005; TWINE *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2007; AL DAHOUK *et al.*, 2008; KHEMIRI *et al.*, 2008). Apesar de todo o poder analítico conhecido das tecnologias baseadas em espectrometria de massas, as amostras devem ser criteriosamente preparadas e frequentemente requerem a padronização do sistema

escolhido para análise (MOTTAZ-BREWER *et al.*, 2008).

A comparação do proteoma da MT78 obtida nessas condições com o proteoma da MT78 crescida em meio de cultivo celular permitirá distinguir as proteínas expressas quando em contato com o hospedeiro daquelas que são expressas constitutivamente. Além disso, através da padronização de cada etapa requerida para a obtenção de uma amostra de qualidade, estabelecemos uma metodologia de recuperação de bactérias intracelulares, técnica que poderá ser utilizada para o co-cultivo de outros patógenos ou com outras células eucarióticas.

As proteínas de APEC MT78 determinantes para a invasão dessa bactéria a células não-fagocitárias poderão ser adesinas ou invasinas presentes na superfície bacteriana ou ainda proteínas citosólicas que de alguma forma são essenciais para a invasão de MT78. Desse modo, em um segundo momento, os objetivos foram (i) comparar a eficiência e o rendimento de diferentes métodos de lise celular para obtenção de proteínas; e (ii) padronizar o reisolamento da bactéria associada a CEC-32 no sistema de co-cultivo, partindo de técnicas já descritas.

Se bactéria precisar estar viável para sua internalização indica que a bactéria secreta e/ou sintetiza proteína (s) que são requeridas na indução da internalização. Para a análise das proteínas bacterianas produzidas sob o contato com a célula eucariótica estudos proteômicos, sob condições bem definidas, surgem como uma boa opção de investigação em sistemas mais complexos (HAN & LEE, 2006).

Uma vez definida e padronizadas as condições de análise, no ultimo capítulo da dissertação apresento os resultados proteômicos de APEC MT78 obtidos até o momento. Foram testadas ao menos três abordagens diferentes, com ou sem pré-fracionamento da amostra. O objetivo inicial foi identificar o maior número possível de proteínas bacterianas, e que elas estivessem distribuídas nas suas categorias funcionais proporcionalmente ao predito no genoma, focando principalmente em proteínas localizadas na membrana bacteriana. Padronizando a metodologia nesse trabalho, finalmente poderemos, como um objetivo final, identificar proteínas da APEC MT78 que são expressas quando da interação da bactéria com a célula aviária (fibroblastos de linhagem CEC-32), numa aproximação do que ocorre na colonização do epitélio das vias aéreas *in vivo*. Dados sobre proteínas de ExPEC de maneira geral

são bastante limitados. No nosso entendimento, essa é a primeira investigação proteômica global de APEC em contato com células aviárias em uma aproximação do ambiente encontrado por essa bactéria no seu hospedeiro.



### **3 OBJETIVOS DO TRABALHO**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é estabelecer uma metodologia eficaz para a recuperação de proteínas de bactérias associadas a fibroblastos CEC-32, para posterior análise das proteínas bacterianas utilizando uma abordagem proteômica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

a) Analisar a interação da APEC MT78 com fibroblastos aviários CEC-32 por microscopia óptica e eletrônica;

b) Padronizar o método de extração de proteínas bacterianas;

c) Padronizar a técnica de recuperação da APEC MT78 aderida/internalizada;

d) Padronizar o fracionamento do extrato proteico das bactérias recuperadas;

e) Padronizar a metodologia de espectrometria de massas.

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Linhagens utilizadas e manutenção

O microrganismo utilizado como modelo desse estudo é a cepa APEC MT78, sorotipo 02:K1:H+, isolada da traquéia de uma galinha com colibacilose, associada à infecção com *Mycoplasma sp.*, na França (DHO & LAFONT, 1982). A cepa nos foi cedida por Lothar H. Wieler (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Universidade Livre de Berlim, Alemanha), que a recebeu de John M. Fairbrother (Departamento de Patologia e Microbiologia, Universidade de Montreal, Quebec, Canadá). A cepa apresenta grande capacidade de adesão e invasão em fibroblastos (MATTER *et al.*, 2010) e causa infecção sistêmica quando inoculada pela traquéia em frangos de 5 semanas de idade, observado em experimento *in vivo* (HORN *et al.*, manuscrito em preparação). A cepa MT78 apresenta resistência ao ácido nalidíxico e contém os seguintes fatores associados à virulência: adesinas *fimC*, *crl* e *hra*; sistemas sideróforos *chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iroN*, *irp2*, *iucD*, *sit chr.* e *sit ep.*; protectinas *iss*, *neuC*, *kpsMT*, *ompA* and *traT*; invasinas *GimB* e *ibeA*, and genes para ColV (*cvi/cva*) and *malX*. (MATTER *et al.*, 2010). Nos experimentos de associação, as cepas de *Salmonella typhimurium* SL1344 e *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

As cepas foram mantidas em freezer -80° C em caldo LB (Luria Bertani) e 20% de glicerol. Previamente aos experimentos, as cepas foram semeadas em placas de LB ágar a 37° C durante a noite. Para os experimentos de infecção, uma colônia de cada cepa foi crescida em 5 mL de caldo LB durante a noite a 37 °C; no dia do experimento, uma alíquota desta suspensão foi inoculada em caldo LB em uma diluição de 1:100 e incubados novamente a 37° C sob agitação (180 rev/min) até o início da fase exponencial (D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,3-0,4). O número de bactérias viáveis neste ponto foi estimado previamente pela análise do número de unidades formadoras de colônia (UFC), após diluições seriadas, em placas de LB-ágar. Neste ponto, as bactérias foram colhidas por centrifugação (10 min 4000 g) e ressuspendidas em meio DMEM para infecção das células.

Para os experimentos utilizando bactérias inativadas por calor, uma alíquota da cultura bacteriana no início da fase exponencial foi retirada e mantida em banho-maria a 80° C por 10 min. As bactérias foram, então, coletadas por centrifugação (10 min 4000 g), ressuspensas em meio de infecção e utilizadas para a infecção das células.

#### **4.2 Linhagem eucariótica utilizada**

Para o estudo da interação célula eucariótica e APEC foi utilizada a linhagem CEC-32 de fibroblastos aviários (KAADEN *et al.*, 1982), cedida por Bernd Kaspers (Universidade de Munique, Alemanha). A CEC-32 foi escolhida por representar uma linhagem de células aviárias não-fagocitárias e por já ter apresentado um bom resultado em estudo prévio (MATTER *et al.*, 2010). Elas foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), 10% de SFB e 2 mM de glutamina, a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, em atmosfera úmida.

#### **4.3 Ensaio de infecção de CEC-32**

Fibroblastos CEC-32 foram plaqueados em placas de 6 ou 24 poços numa densidade de  $7,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em meio DMEM, adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2 mM glutamina, 48 h antes da infecção. Para os experimentos de coloração com Giemsa e microscopia de varredura, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro. Imediatamente antes da infecção, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e adicionou-se meio (DMEM) fresco adicionado ou não de 10% de SFB. Os ensaios destinados à coleta de amostra para proteômica foram conduzidos sem SFB (ver em seção resultados). As células foram infectadas na multiplicidade de infecção (MI) 20 ou 200 bactérias por célula e centrifugadas a 500 g por 10 min à temperatura ambiente, para “sincronizar” o contato bacteriano às células. As células foram reincubadas à 37° C, 5% de CO<sub>2</sub>, atmosfera úmida até completar 1 h pós-infecção. Nesse ponto, as células foram lavadas três vezes com tampão PBS e processadas de acordo com uma das técnicas descritas abaixo.

Para os ensaios proteômicos, o mesmo inóculo de bactérias para infecção das

células foi semeado em meio DMEM e incubado pelo mesmo tempo e nas mesmas condições das células infectadas, quando as bactérias foram recolhidas por centrifugação (4000 g, 10 min, 4 °C) para a sequência dos experimentos.

#### **4.3.1 Ensaio de associação de APEC a célula-alvo**

Para quantificar o número de bactérias viáveis associadas aos fibroblastos CEC-32, os fibroblastos foram plaqueados em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) e infectados em MI de 20 ou 200 UFC/célula, como descrito acima. Após as lavagens, as células infectadas foram lisadas em PBS contendo Triton X-100 1%. Uma alíquota de 100 µL do lisado foi diluído e semeado sobre ágar LB e incubadas a 37 °C por 24 h. O número de UFC por placa foi contado e foi então determinado o número de bactérias associadas à célula hospedeira. Os experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes em quadruplicata.

#### **4.3.2 Coloração de Giemsa**

Após as lavagens com tampão PBS, as células infectadas sobre lamínulas foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBS por 10 min a temperatura ambiente, seguido de uma nova lavagem com PBS. O tampão foi removido e as células lavadas com água destilada. Para a coloração, o corante Giemsa (Merck) foi diluído na proporção de 12 gotas para 10 mL de água destilada e adicionado às células por 20 min. Após, as amostras foram lavadas duas vezes com água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente. As lamínulas foram levadas ao microscópio ótico com óleo de imersão para análise em 1000 X. As imagens foram captadas no microscópio Axioskop40/Zeiss acoplado à câmera AxioCam MRC.

#### **4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Após as lavagens com PBS, as células infectadas sobre lamínulas foram fixadas com solução contendo 1,2 mL de glutaraldeído 25% (Merck), 5 mL de tampão fosfato 0,2 M em água destilada q.s.p. 10 mL, pH 7,2, por 1 semana a 4 °C. O fixador foi

removido e as células lavadas três vezes com tampão fostato 0,1 M. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona em água até acetona pura. Nessa etapa, as amostras foram levadas ao equipamento Point Dryer (Balzers) para substituição da acetona por CO<sub>2</sub>. As amostras foram observadas no microscópio JSM 6060 após a metalização da superfície das amostras com ouro.

#### **4.3.4 Ensaio de isolamento de APEC associada à CEC-32**

Duas metodologias de recuperação da bactéria foram testadas após a infecção, com o objetivo de padronizar o método de melhor rendimento. O método 1 foi desenvolvido para isolamento de organelas celulares (FUGIER *et al.*, 2009) e o método 2 para isolamento de RNA de bactéria intracelular (ERIKSSON, *et al.*, 2003). Ambos os experimentos foram conduzidos a 4 °C.

##### **a) Método do gradiente de sacarose (método 1)**

Após as lavagens com PBS, as células infectadas oriundas de 2 placas de 6 poços foram lisadas com 1 mL/poço de Triton X-100 0,2% em tampão de homogeneização (20 mM de HEPES-KOH, pH 7,2, 250 mM de sacarose e 0,5 mM de EGTA). Após, os lisados foram coletados e centrifugados a 400 g por 5 min. O sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido, descongelado a temperatura ambiente e diluído 3 vezes com tampão de homogeneização e então centrifugado a 12.000 g por 1 min. O precipitado foi ressuscitado em 100 µL do mesmo tampão, adicionado de 900 µL de solução de sacarose 12% e centrifugado a 170 g por 45 min. As células bacterianas precipitadas foram ressuscitadas em Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e lavadas mais duas vezes.

##### **b) Método de solubilização diferencial de membranas (método 2)**

Após a lavagem, as células foram lisadas com 1 mL/poço de solução de lise (0,1% SDS, 1% de fenol ácido e 19% de etanol) por 30 min. Os lisados de duas placas foram coletados e centrifugados a 5000 g por 20 min. O precipitado contendo células bacterianas foi ressuscitado em Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e lavado com tampão mais 2 vezes. As células bacterianas isoladas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão ou lisadas.

#### 4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Uma porção de 50  $\mu\text{L}$  de células bacterianas isoladas da infecção foi diluída em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, lavada duas vezes no mesmo tampão e fixada em solução de fixação para MET (1% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M) durante a noite. As células foram então lavadas 3 vezes no tampão fosfato e expostas a tetraóxido de ósmio 1% por 45 min. Após 3 lavagens adicionais com tampão fosfato, as células foram gradualmente desidratadas em lavagens em soluções de concentrações crescentes de etanol em água até etanol 100%, 10 min cada. As amostras foram infiltradas com solução de etanol e resina LR White (1:1) e lavadas 3 vezes em resina pura, 15 min cada. Na última lavagem, a amostra foi incluída em resina em estufa de 60 °C para polimerização. Os blocos contendo as amostras foram cortados em ultramicrótomo com navalha de diamante em secções de 70 nm e as secções montadas em telas Copper (100 *mesh* cobertas com filme de carbono) próprias para microscopia. As secções foram pós-fixadas com acetato de uranila 1 % seguido de contraste com citrato de chumbo. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM1200 EXII a 120 kV. As imagens foram coletadas digitalmente em câmera CCD acoplada ao microscópio.

#### 4.5 Lise celular

Partindo de uma cultura de *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  crescida em caldo LB até o início da fase exponencial (D.O.  $_{600\text{ nm}}$  – 0,3 - 0,4), a cultura é centrifugada e ressuspensa em tampão (20 mM Tris-HCl pH 7,5). Três métodos de lise bacteriana foram testados: a lise por ultrassonicação, na qual a amostra é submetida a 7 ciclos médios de 8 seg de ultrassom, intercalados com banho de gelo; a lise por esferas de vidro, feita em 5 ciclos de 30 seg no vórtex, intercalados com 1 min de banho de gelo; e a lise por ciclos de congelamento-descongelamento, realizada no mesmo tampão adicionado de 10 mM de DTT e 2% (w / v) Triton X-100, na qual a amostra é submetida a 30 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido intercalados de 1 min em banho a 37 °C. Após a lise, as amostras foram centrifugadas 15.000 g por 5 min, o sobrenadante separado para quantificação pelo método BCA® (Pierce) e posteriormente liofilizado para as

análises subsequentes. Os métodos foram analisados quantitativa e qualitativamente para escolha do método mais adequado. Os experimentos foram realizados ao menos 3 vezes em quadruplicata.

#### **4.6 Eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida-SDS**

As amostras proteicas (20 ou 200  $\mu\text{g}$ ) foram misturadas a 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra e fervidas a 98 °C por 5 *min*. Após, as amostras foram aplicadas ao gel composto de gel de resolução 12% e o gel de empacotamento 7,5% (SAMBROOK *et al.*, 1989), para corrida eletroforética a 120 V. Após, o gel foi corado com Comassie blue <sup>®</sup> por 20 min e descorado em solução descorante contendo metanol e ácido acético em água. Os géis destinados a cortes e tripsinização foram preparados com água MilliQ.

#### **4.7 Tripsinização em gel**

Cada poço do gel foi carregado com 200  $\mu\text{g}$  do extrato de proteínas. A canaleta da amostra foi cortada em 10 ou 30 fatias e cada uma dessas fatias foi individualmente triturada e acomodada em microtubo. Segui o protocolo desenvolvido por SHEVCHENKO *et al.* (1996). As bandas de cada fatia do gel foram descoradas com 500  $\mu\text{L}$  de uma solução 50% metanol/ 5% ácido acético em água durante a noite a temperatura ambiente. No dia seguinte, a solução foi trocada por 200  $\mu\text{L}$  da mesma solução por 2 a 3 horas. Após, essa solução foi descartada e cada fatia do gel foi desidratada com 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila por 5 min. A acetonitrila foi descartada e os resíduos foram evaporados no SpeedVac (modelo AC1010) por 2 a 3 min. Os pedaços do gel foram reduzidos com 30  $\mu\text{L}$  de DTT por 30 min a temperatura ambiente; o DTT foi então removido e os pedaços do gel alquilados com 30  $\mu\text{L}$  iodoacetamida 50 mM por 30 min a temperatura ambiente. Após a remoção da solução de iodoacetamida, as fatias do gel foram lavadas com 100  $\mu\text{L}$  de solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min. Essa solução foi removida e os pedaços do gel novamente desidratados com 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila por 5 min. A acetonitrila foi removida e o gel reidratado em 100  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min. O processo de desidratação foi repetido mais uma vez e o resíduo de acetonitrila foi removido no SpeedVac. Nessa

etapa ocorreu a digestão das proteínas por adição de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 20 ng de tripsina gold® (Promega)/  $\mu\text{L}$  a 37° C por toda a noite. As fatias do gel foram então adicionadas de 30  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio 100 mM, agitadas no vórtex, incubadas por 10 min, centrifugadas, e o sobrenadante separado. Os peptídeos foram extraídos 2 vezes com 30  $\mu\text{L}$  de uma solução de 5% ácido fórmico em 50% de acetonitrila por 10 min (modificado de Shevchenko *et al.*, 1996). Cada uma das 10 ou 30 amostras foi transferida para o tubo Total Recovery® da Waters para análise em espectrômetro de massas em sequência (ESI-MS/MS).

#### 4.8 Tripsinização em solução

Após a lise e quantificação da amostra proveniente da associação, uma alíquota de 50  $\mu\text{g}$  de amostra foi diluída em 50  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 em microtubo e seguiu o protocolo desenvolvido pela Waters Corporation, Mass Spectrometry Applications Research and Development Laboratory (comunicação pessoal). Adicionei 10  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio 50 mM seguido de 25  $\mu\text{L}$  de solução de Rapigest SF® 0,2 %. O tubo foi aquecido a 80 °C por 15 min. A amostra foi reduzida (2,5  $\mu\text{L}$  de DTT 100 mM) sob aquecimento e posteriormente alquilada (2,5  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida 300 mM) no escuro por 30 min. Após, as amostras foram digeridas em solução de tripsina gold® (Promega) numa proporção de 1:100 (enzima:proteína) durante a noite a 37 °C. Após a digestão, o Rapigest foi hidrolizado com 10  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético 5 % e as amostras incubadas por 90 min a 37 °C. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 1400 g, 6 °C por 30 min e o sobrenadante transferido para o tubo Total Recovery® da Waters para análise em espectrômetro de massas em sequência (ESI-MS/MS).

#### 4.9 Espectrometria de massas e análise de bioinformática

Os peptídeos foram inicialmente separados por cromatografia líquida de fase reversa em coluna C18 nanoACQUITY UltraPerformance LC® (UPLC®), fluxo de 0,60  $\mu\text{L}/\text{min}$  com um gradiente linear de 5-90 % acetonitrila/água por 60 min. Após a eluição, os peptídeos foram ionizados por eletrospray e entraram diretamente na célula de colisão do espectrômetro de massas em sequência (MS/MS) Q-TOF Micro™ (Waters



Corporation®). Os espectros de massas da dissociação induzida por colisão dos peptídeos ionizados foram usados para identificar os peptídeos de cada fração de gel no software MASCOT® (<http://www.matrixscience.com>) contra o banco de dados geral de *E. coli*. A variação de massa tolerada para os peptídeos foi de 0,2 Da. Os demais parâmetros de busca incluem, como modificação fixa, a carbamidometilação dos resíduos de cisteínas, e como modificação variável, a oxidação dos resíduos de metionina. Os índices de falso-positivo nas sequências de proteínas identificadas foram checados automaticamente contra o banco de dados Decoy. Cada uma das duas amostras biológicas foi analisada em duplicata no espectrômetro de massas. A informação funcional das proteínas identificadas foi buscada no banco de dados do UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) e classificadas conforme o COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins).

#### **4.10 Análise estatística**

Os resultados estão expressos em valores de média e desvios-padrão positivos e negativos. O teste T de Student e o One-way ANOVA foram utilizados para comparar grupos usando o software GraphPad InStat3.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Viabilidade bacteriana

A viabilidade obtida para as cepas foi: MT78 =  $1,94 \times 10^8$  UFC/mL (D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,344); K12 DH5 $\alpha$  =  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL (D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,357) e SL1344 =  $2,2 \times 10^8$  CFC/mL (D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,310)

### 5.2 Associação de APEC MT78 a fibroblastos aviários CEC-32 e análise da interação da APEC MT78 por microscopia óptica e eletrônica

Como mencionado anteriormente, a quantidade da amostra para análises proteômicas globais no modelo de interação é crítica, pois o proteoma da célula eucariótica não deve sobrepujar o proteoma do microrganismo alvo do estudo. Logo, para analisar a APEC MT78 isolada da interação com as células-alvo é necessário um grande número de bactérias aderidas. Para isso, infectamos fibroblastos CEC-32 por 1 h com APEC MT78 em multiplicidade de infecção (MI) de 20 e 200 UFC/célula, com o objetivo de (i) comparar os resultados obtidos nesse trabalho com os resultados obtidos por Matter e colaboradores (2010); (ii) verificar se a associação de APEC MT78 aos fibroblastos é dependente da MI e (iii) analisar a natureza dessa interação que leva à internalização da bactéria. Após o tempo de interação, as células foram lisadas e os extratos plaqueados para contagem, ou fixadas para coloração de Giemsa e microscopia eletrônica de varredura.

A Figura 1a mostra que a cepa MT78 foi capaz de associar-se mais eficientemente a CEC-32 que *E. coli* K12 ( $p < 0,001$ ), controle negativo. Além disso, a capacidade de adesão foi proporcional à MI. Esse resultado ficou mais claro quando expresso em valores de UFC por célula (Fig. 1b), que leva em consideração o número de células por poço durante o experimento. Não se observou alterações estatisticamente significativas na contagem de UFC associada quando o soro fetal bovino foi removido do meio de infecção (MI=20  $p = 0,0721$  e MI= 200  $p = 0,3321$ ). Esses resultados foram confirmados na análise por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura das células infectadas (Figuras 2 e 3). Por microscopia óptica, foi possível observar que 100 % das células estavam infectadas (não-mostrado). As

células mantidas sem SFB por 1 h não apresentaram alterações morfológicas e injúrias quando comparadas às células mantidas em meio completo (não-mostrado). Da mesma forma, as células infectadas não apresentaram diferenças no padrão de associação na presença ou ausência de SFB (Fig. 2a e 2b respectivamente). Coletivamente, os dados mostraram que o tempo de 1 h sem soro pode ser aplicado neste estudo, diminuindo as proteínas eucarióticas interferentes na análise proteômica bacteriana posterior. Observando em maior aumento (Fig. 2d e 2e), as setas mostram bactérias em processo de invasão e bactérias já internalizadas, respectivamente; assim o tempo de 1 h de infecção seria o tempo ideal para análise das proteínas de MT78 importantes para o fenótipo invasivo.

O padrão de adesão localizada de MT78 a CEC-32 também pode ser visualizado por microscopia eletrônica de varredura (Fig. 3a). Além disso, a MT78 aderida parece formar microcolônias embebidas em uma matriz extracelular com características de biofilme (Fig. 3b). A aproximação da imagem mostra que MT78 ainda carrega estruturas na sua superfície que a conectam à célula-alvo e parecem favorecer a invasão (Fig. 3c e 3d); interessantemente, a bactéria que já iniciou o processo de invasão parece retrair as mesmas estruturas ou as apresenta mais raramente (Fig. 3e). As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram que, de alguma maneira, a bactéria aderida induziu na célula-alvo a formação de estruturas que se assemelham a estruturas celulares dependentes da polimerização de actina do citoesqueleto, como filopódios (Fig. 3f) e lamelipódios (Fig. 3g). Quando as células são infectadas por bactérias inativadas pelo calor, a adesão diminuiu significativamente, reduzindo-se a poucas (Fig. 3h) ou nenhuma bactéria aderida (Fig. 2f). Ainda é possível verificar que a bactéria inativada que aderiu não apresentou as mesmas estruturas que a bactéria viável aderida apresentou (Fig. 3i). Logo, a adesão e a invasão dependem da viabilidade da bactéria, o que sugere que a APEC MT78 sintetiza ou secreta proteínas já sintetizadas para ativamente induzir sua internalização por CEC-32.

Fig. 1a

## Índice de associação

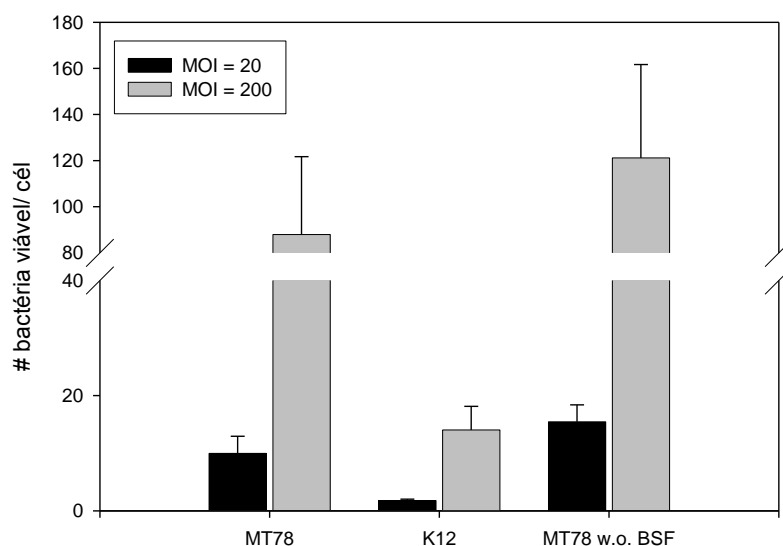
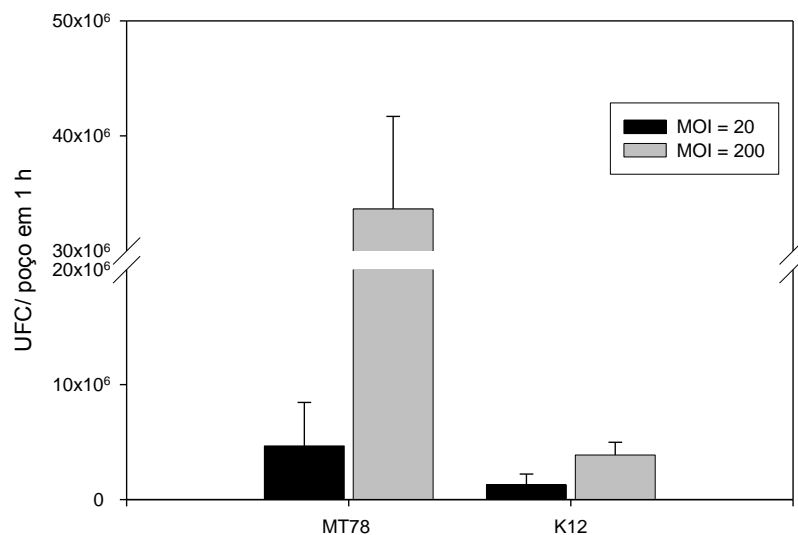
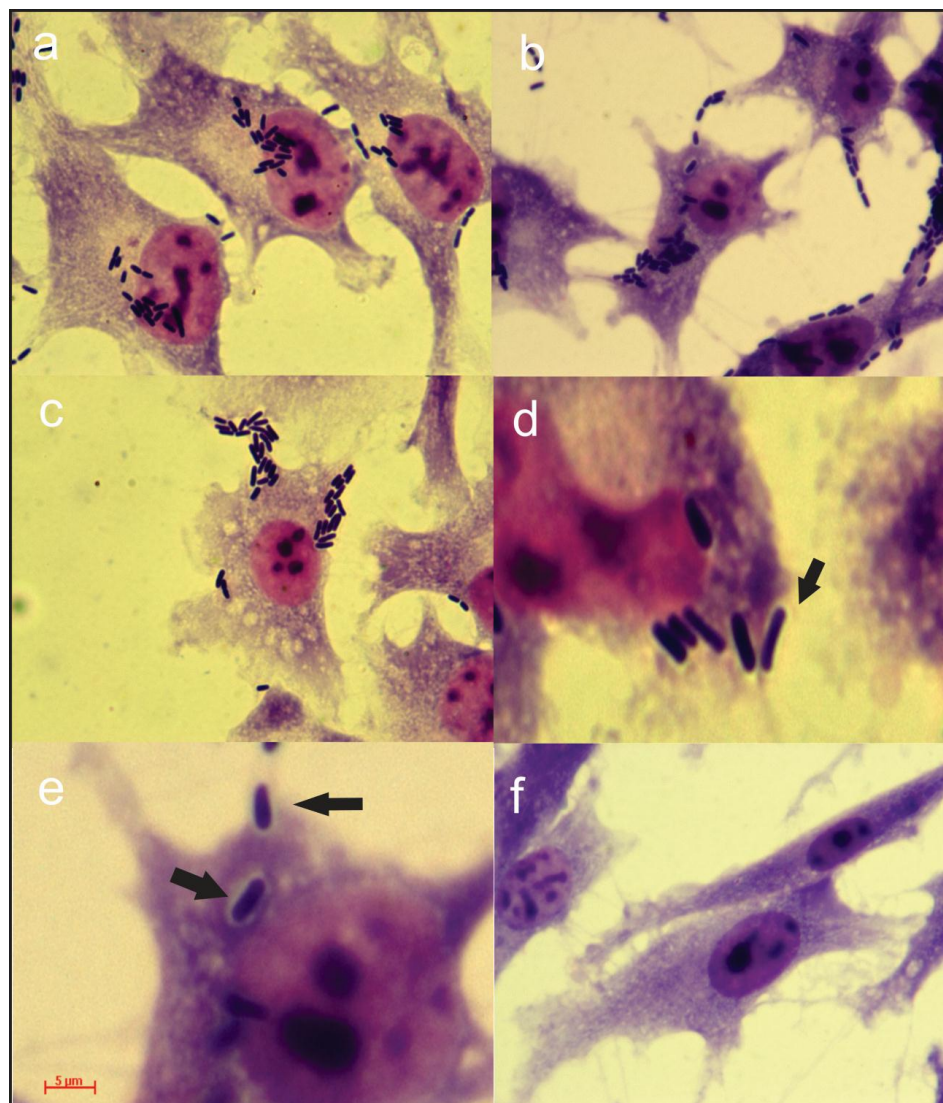


Fig. 1b

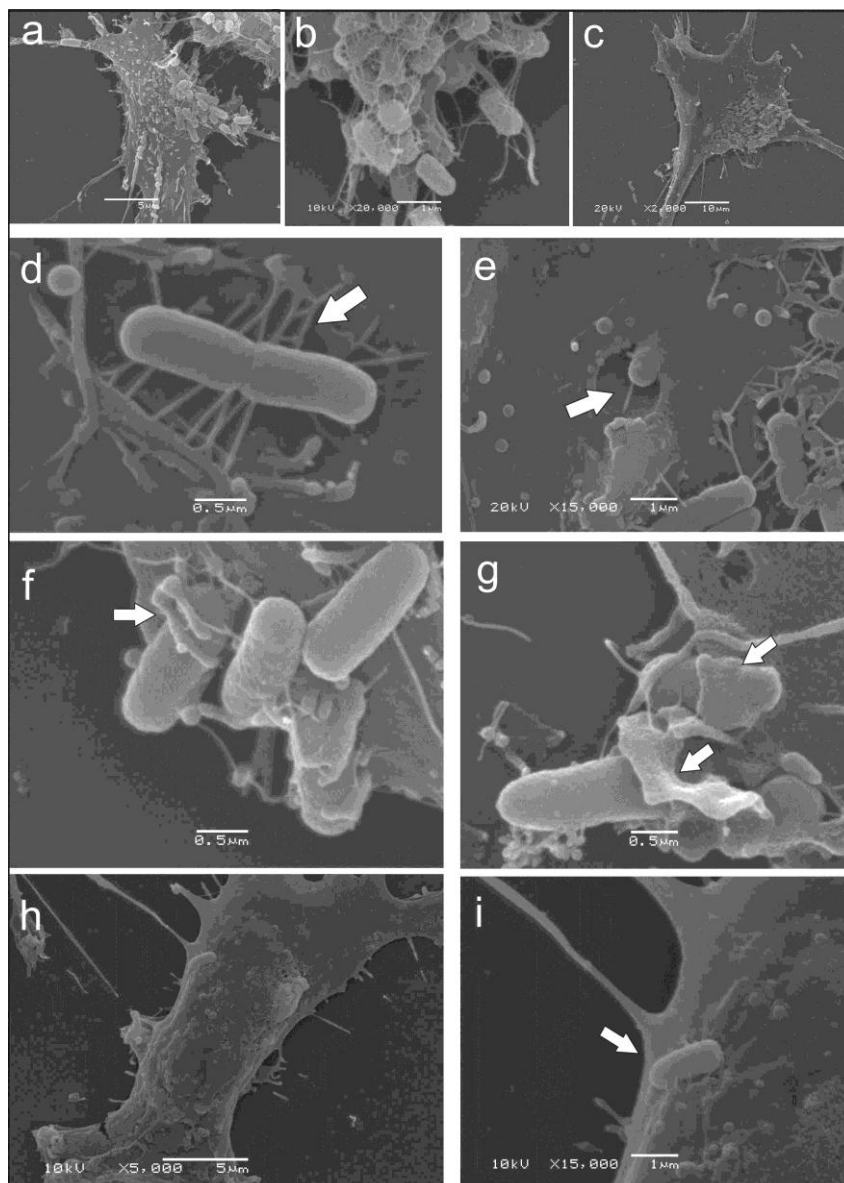
## Associação de APEC à CEC-32



**Fig. 1. Associação de APEC MT78 a fibroblastos CEC-32.** Células foram infectadas com uma MI de 20 e 200 UFC/ célula como descrito em Materiais e Métodos. Após 1 h, células foram lavadas e lisadas e os extratos plaqueados em LB ágar para contagem das UFC. (a) resultados expressos em UFC/ poço e (b) expressos em UFC/ célula. Dados apresentados como média e desvio-padrão de 4 experimentos em quadruplicata e analisados com One-way ANOVA.



**Fig. 2. Características fenotípicas da associação MT78-CEC-32.** Células CEC-32 foram infectadas com APEC MT78 na MI=20; após 1 h de infecção, as células foram lavadas com PBS, fixadas e coradas com Giemsa, conforme descrito em materiais e métodos. As amostras foram observadas sob microscópio óptico em magnificação 1.000x. (a) e (b) células infectadas na presença e ausência de SFB, respectivamente; (c) padrão de adesão localizada de APEC MT78; (d) APEC MT78 invadindo a célula-alvo (seta) e (e) já internalizada dentro de um vacúolo (seta); (f) células infectadas com bactérias inativadas pelo calor (80 °C, 10 min).



**Fig. 3. Microscopia eletrônica de varredura de fibroblastos CEC-32 infectados com APEC MT78 viável e inativada pelo calor.** Uma hora após a infecção, a APEC MT78 apresentou-se associada à CEC-32 em um padrão de adesão localizada (a e c), formando microcolônias embebidas em uma matriz típica de biofilme (b e c). Estruturas de adesão são aparentes na superfície da bactéria associada (d), e não evidentes quando a bactéria iniciou seu processo de invasão (e, f e g). A bactéria promove rearranjos na membrana eucariótica semelhantes a filopódios (f, seta) e lamelipódios (g, seta). Poucas ou nenhuma bactéria aderem a CEC-32 quando inativadas pelo calor (h). Quando aderida, a MT78 inativada não apresenta as mesmas estruturas de superfície e não é capaz de induzir rearranjos na membrana da célula (i, seta).

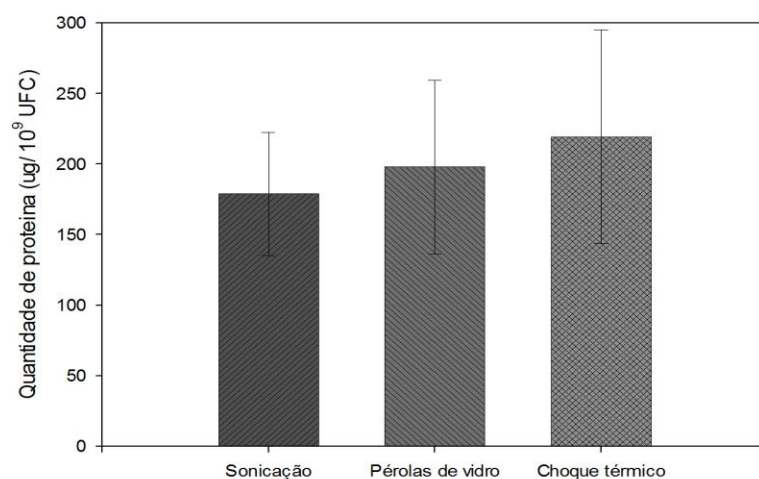
## 5.3 Padronização da metodologia de preparação da amostra para proteômica

### 5.3.1 Preparação de proteínas bacterianas totais

Para a obtenção de proteínas de membrana e citosólicas de *E. coli*, são necessárias técnicas que rompam a membrana e parede celulares bacterianas. No nosso caso, partimos da premissa de que teríamos uma amostra bastante reduzida quando reisolada da interação, portanto o rendimento da lise celular torna-se bastante importante. Quatro diferentes métodos foram testados neste trabalho: (1) a Prensa de French; (2) lise por pérolas de vidro; (3) lise por ciclos de congelamento e descongelamento, e (4) sonicação.

O rompimento das células de *E. coli* com sonicação, pérolas de vidro e choque térmico está mostrado na Fig. 4. Amostras de 10 mL de cultura de *E. coli* K12 na fase log do crescimento ( $O.D._{600} = 0,3-0,4$ ) foram precipitadas, lavadas e submetidas a ciclos de lises, conforme descrito na seção 3, e posteriormente quantificadas. A maior quantidade de proteína obtida foi através da lise por ciclos de choque térmico ( $\sim 220 \mu\text{g}/10^9 \text{ UFC}$ ) (Fig. 4a). Porém, na comparação de valores absolutos de quantidade de proteína obtida, não foi possível distinguir diferenças estatisticamente significantes entre as três metodologias. Na análise qualitativa (Fig. 4b), no entanto, o método de sonicação destacou-se pela presença de uma banda de proteína (massa molecular entre 20 e 29 Kda) que estava ausente nos outros dois métodos. A presença dessa banda repetiu-se em todas as 4 replicatas. Apesar do maior rendimento em quantidade de proteínas obtido pelo choque térmico, essa metodologia não forneceu, a julgar pelo SDS-PAGE, várias proteínas encontradas nas outras metodologias (massa molecular entre 7 e 25 Kda) (Fig. 4b). Portanto, o método de sonicação mostrou-se o mais adequado para romper células de *E. coli* para análise proteômica.

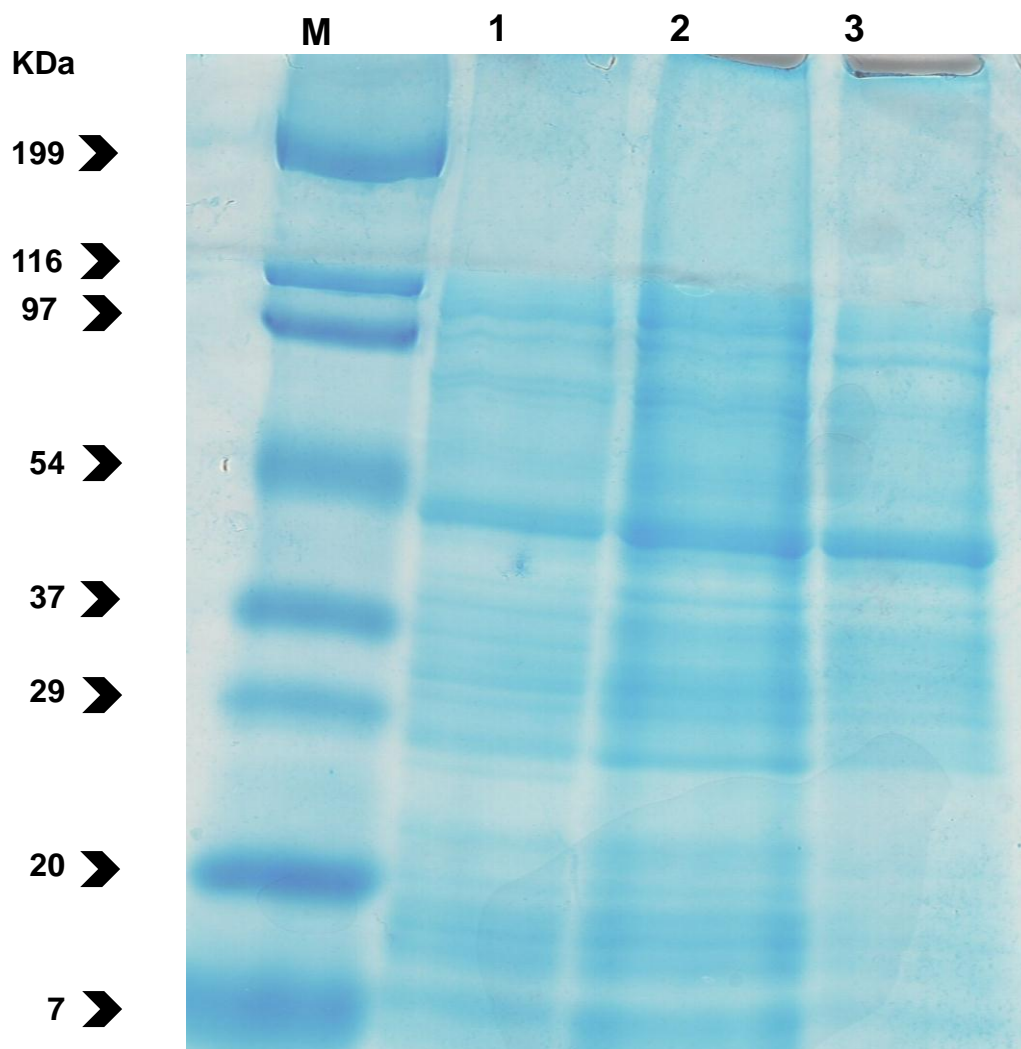
Fig. 4a



**Figura 4. Comparação quantitativa e qualitativa da quantidade de proteína após lises por sonicação, pérolas de vidro e choque térmico.** (a) Comparação quantitativa, em  $\mu\text{g}$  de proteína, do rendimento das três metodologias na lise de  $10^9$  UFC. Os resultados expressam a média e desvios-padrão de 3 experimentos feitos em quadruplicata, analisados com o teste One-way ANOVA ( $p= 0,2894$ ). (b) Comparação qualitativa. Vinte  $\mu\text{g}$  de proteína foram separadas em SDS-PAGE, fixadas e coradas com Comassie blue. As canaletas 1, 2 e 3 representam sonicação, pérolas de vidro e choque térmico, respectivamente. A linha M representa o marcador de massa molecular.



Fig. 4b

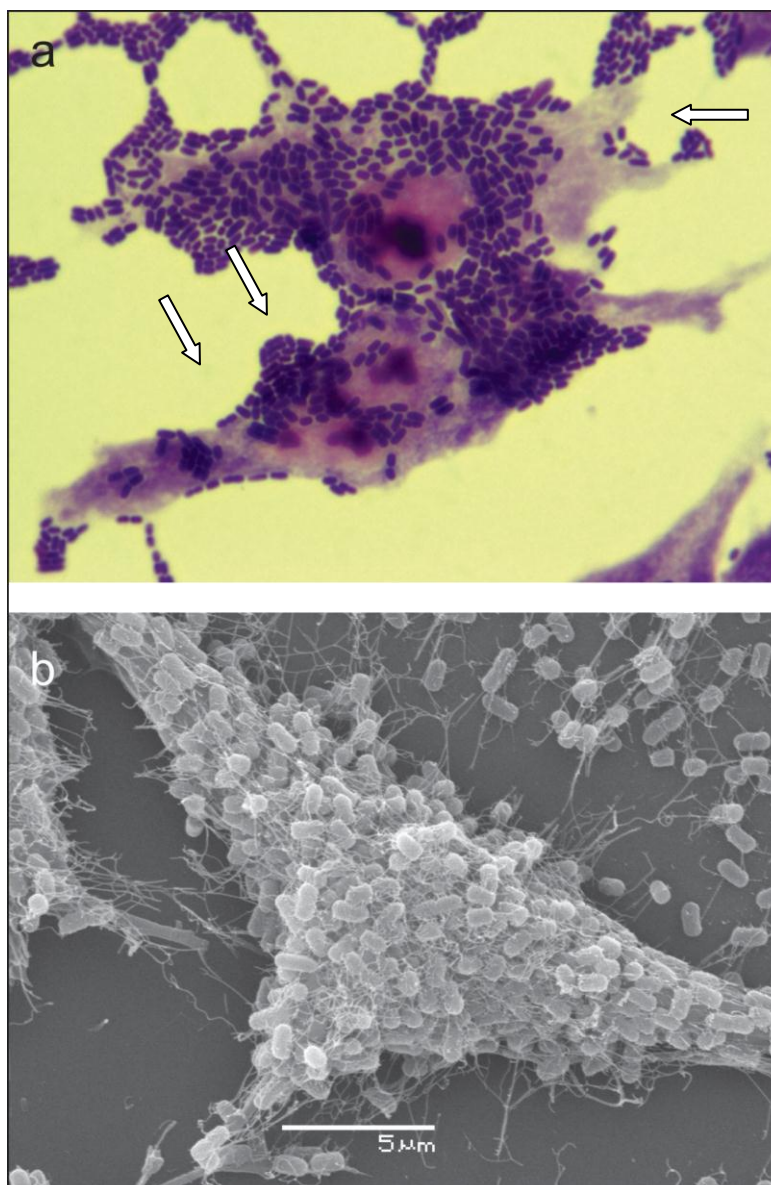


**Figura 4. Comparação quantitativa e qualitativa da quantidade de proteína após lises por sonicação, pérolas de vidro e choque térmico.** (a) Comparação quantitativa, em  $\mu\text{g}$  de proteína, do rendimento das três metodologias na lise de  $10^9$  UFC. Os resultados expressam a média e desvios-padrão de 3 experimentos feitos em quadruplicata, analisados com o teste One-way ANOVA ( $p= 0,2894$ ). (b) Comparação qualitativa. Vinte  $\mu\text{g}$  de proteína foram separadas em SDS-PAGE, fixadas e coradas com Comassie blue. As canaletas 1, 2 e 3 representam sonicação, pérolas de vidro e choque térmico, respectivamente. A linha M representa o marcador de massa molecular.

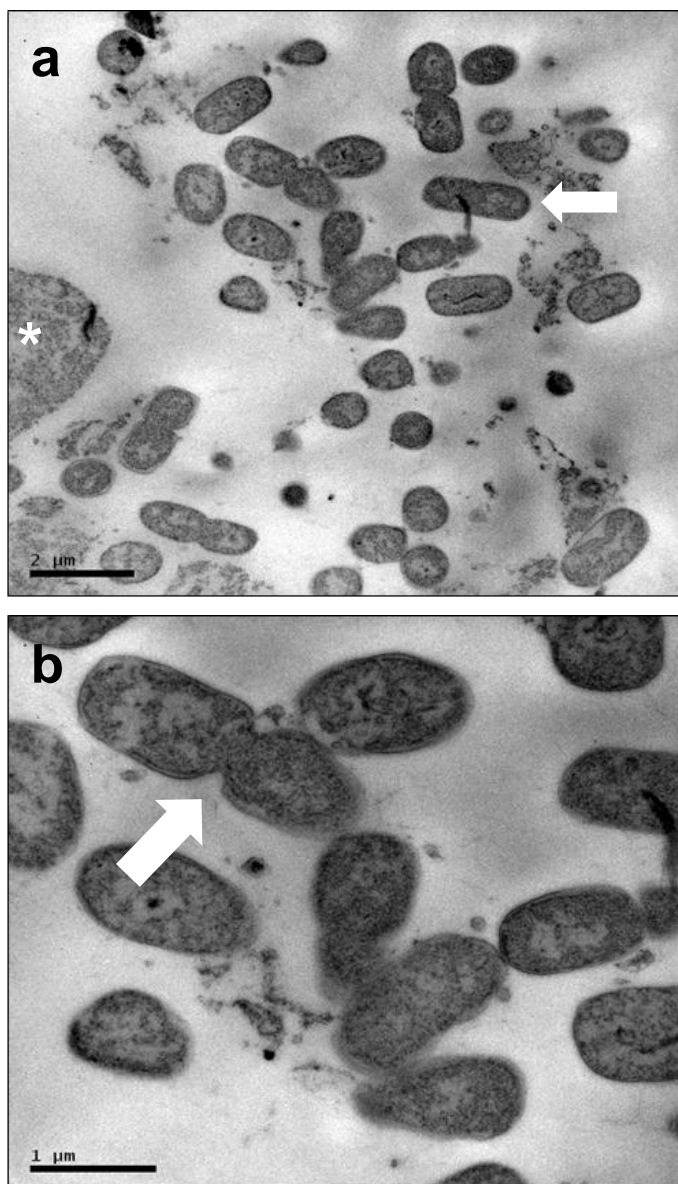
### 5.3.2 Recuperação de bactérias associadas à CEC-32 no modelo de co-cultivo

Com o método de gradiente de sacarose (método 1), foi possível obter uma média de rendimento de 521,1  $\mu\text{g}$  de proteínas totais partindo de  $2,4 \times 10^7$  células infectadas com MI de 200 UFC/célula. As bactérias reisoladas por esse método permaneceram viáveis, pois houve crescimento das bactérias reisoladas em LB-ágar.

Com o método de solubilização diferencial (método 2), foi possível obter um rendimento maior com uma quantidade menor de células por experimento: média de 1,1 mg de proteínas totais partindo de  $1,2 \times 10^7$  células infectadas com MI de 200 UFC/célula. Porém, as bactérias não permaneceram viáveis, pois não houve multiplicação das bactérias reisoladas em LB-ágar. A análise por microscopia eletrônica de transmissão de APEC MT78 reisolada pelo método 2, no entanto, revelou um grande número de bactérias recuperadas pela técnica (Fig. 6a). As bactérias apresentaram-se com suas membranas citoplasmáticas íntegras e algumas apareceram inclusive em divisão celular (Fig. 6b), apesar de não estarem mais viáveis. A análise das microscopias ainda permitiu identificar a alta pureza da amostra, pois não se observou grande quantidade de restos de células ou organelas eucarióticas (Fig. 6). Devido à alta pureza e rendimento da amostra, aliado a uma maior agilidade na preparação, o método de solubilização diferencial (método 2) foi o método escolhido para o reisolamento das bactérias em co-cultivo.



**Fig. 5. Microscopias ótica e eletrônica de varredura de fibroblastos CEC-32 infectados com APEC em MI=200.** Após 1h de interação, as células foram fixadas conforme descrito em materiais e métodos. (a) Na coloração com Giemsa, a APEC MT78 apresentou-se associada à CEC-32 formando microcolônias maiores (setas), que puderam ser observadas na microscopia eletrônica de varredura em (b), na qual as microcolônias apresentaram-se embebidas em uma matriz típica de biofilme.



**Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão de APEC MT78 recuperada da interação com CEC-32.** Seções ultrafinas dos precipitados das células bacterianas reisoladas. (a) Células bacterianas com membranas intactas (seta) e restos celulares (\*), aumento de 10.000x. (b) Células bacterianas em divisão celular (seta), aumento de 25.000x.

#### **5.4 Identificação de proteínas importantes na associação de APEC MT78 a CEC-32 por análise proteômica**

Na tentativa de determinar qual o melhor método para obter o proteoma de APEC, inicialmente testamos o método de tripsinização em gel para amostras de APEC MT78 crescida em meio DMEM, 37 °C, sob agitação, até a fase exponencial. Duzentos microgramas de proteína foram carregados no gel de poliacrilamida-SDS e posteriormente tripsinizadas em frações. Os peptídeos extraídos de 10 fatias da canaleta (10 frações ao todo) foram analisados por LC-MS/MS. A análise dos dados obtidos nessa preparação permitiu a identificação de 86 proteínas de *E. coli*. A lista completa das proteínas identificadas está mostrada na Tabela 1. Uma grande porcentagem das proteínas identificadas está envolvida no processo de tradução e regulação da tradução, seguida de proteínas de função ainda não conhecida (Fig. 7a).

Outro método mais direto de análises proteômicas globais foi testado para tentar aumentar o número de proteínas identificadas. Nesse caso, 50 µg de proteínas extraídas de APEC MT78 reisoladas da interação com CEC-32 foram tripsinizadas em solução, conforme descrito em materiais e métodos. Os peptídeos extraídos foram analisados em LC-MS/MS e as 69 proteínas de *E. coli* identificadas são mostradas na Tabela 2. Novamente as proteínas majoritárias estão envolvidas em processos de tradução e regulação da tradução (Fig. 7b). Além disso, essa abordagem mais direta não permitiu a identificação de um maior número de proteínas e nem mesmo melhorou a distribuição das proteínas identificadas nas suas categorias funcionais.

Por fim, fracionamos o gel de poliacrilamida em 30 cortes, ao invés de 10 cortes, para ampliar o número de proteínas a serem identificadas. Para padronização da técnica, o gel foi carregado com 200 µg de proteínas de *E. coli* K12 DH5α, crescida em LB a 37 °C, sob agitação, até a fase exponencial. Os peptídeos extraídos foram separados por cromatografia líquida em corridas de 2 horas cada fração, seguida de análise por MS/MS. As 130 proteínas identificadas estão listadas na Tabela 3. Um maior número de proteínas em relação às outras abordagens pode ser observado, embora as proteínas envolvidas em processos de tradução e regulação da tradução tenham sido novamente majoritárias nessa abordagem (Fig. 7c). O aumento do pré-

fracionamento da amostra também permitiu a identificação de proteínas bastante diversas quanto a sua função (Tab. 3) e localização subcelular (dados não mostrados), sugerindo que essa abordagem é mais apropriada para análises globais, dadas as limitações técnicas do espectrômetro de massas utilizado.

**Tabela 1.** Relatório das proteínas de APEC MT78 em cultura pura identificadas na preparação de tripsinizacao *in gel* com 10 fatias.

<b>Proteína identificada</b>	<b>Acesso no NCBI</b>	<b>Classificação funcional segundo KOG</b>
50S ribosomal protein L7/L12	gi 15804576	J
transcriptional regulator HU subunit alpha	gi 15804591	K
Elongation factor Tu 1	gi 1942721	J
Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase A	gi 10120773	G
Elongation factor G	gi 15803853	J
unnamed protein product	gi 41030	S
Murein lipoprotein	gi 223967	M
Acyl-coenzyme A dehydrogenase	gi 15801467	I
Bifunctional purine biosynthesis protein purH	gi 7415859	F
pyruvate kinase I	gi 147276	G
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	gi 147730	K
50S ribosomal protein L9	gi 223572	J
unnamed protein product [ <i>E. coli</i> ]	gi 42984	S
50S ribosomal protein L11	gi 42814	J
unnamed protein product [ <i>E. coli</i> ]	gi 43268	S
Phosphate acetyltransferase	gi 1359438	Q
60 kDa chaperonin	gi 1421648	D
Chaperone protein dnaK	gi 15799694	L
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	gi 15799799	G
Trigger factor	gi 55670527	D
RpsA	gi 223404	J
enolase; phosphopyruvate hydratase	gi 563868	G
PTS system mannose-	gi 145688	G e T

specific EIIAB component		
DNA adenine methylase	gi 157158217	L
putative DNA primase from prophage (possibly fragment)	gi 218698910	S
Phosphoglycerate kinase Pgk	gi 15803460	G
putative receptor	gi 15801691	M
ATP synthase subunit beta	gi 15804332	P
Dihydrolipoyl dehydrogenase	gi 15799800	G
ompC	gi 453993	P
Serine hydroxymethyltransferase	gi 7767017	E
Putative heme/hemoglobin transport protein ChuS	gi 15804043	P
Membrane-associated protein UidC	gi 209919271	M
unnamed protein product [ <i>E. coli</i> ]	gi 41761	S
Fructose-bisphosphate aldolase class II	gi 2392284	G
2,3-bisphosphoglycerate- independent phosphoglycerate mutase	gi 15800464	G
hypothetical protein c1877	gi 26247735	S
Acyl carrier protein	gi 15801211	I
Outer membrane protein A	gi 91210052	P
50S ribosomal protein L1	gi 15804574	J
Elongation factor Ts	gi 1942722	J
SitA protein	gi 26247468	P
30S ribosomal protein S3	gi 15803841	J
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkpA	gi 15803860	J
unnamed protein product	gi 466691	S
Single-stranded DNA- binding protein	gi 147870	L
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	gi 15800320	P



Fe/S biogenesis protein nfuA	gi 15803918	J
Ribosome-recycling factor	gi 15799854	J
Elongation factor P	gi 15804739	J
30S ribosomal protein S7	gi 15803854	J
PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein PtsN	gi 442945	G e T
thiol peroxidase	gi 1103833	P
ORF_o259a	gi 537048	S
ribosomal protein L3	gi 42858	J
Superoxide dismutase SodA	gi 3212626	P
unnamed protein product [ <i>E. coli</i> ]	gi 42984	S
50S ribosomal subunit protein L15 [ <i>E. coli</i> ]	gi 606235	J
30S ribosomal protein S3	gi 15803841	J
unnamed protein product	gi 41613	S
50S ribosomal protein L16	gi 15803840	J
DNA-binding protein HU-alpha	gi 15804591	K
Cold shock-like protein CspC	gi 15802236	K
Outer membrane protein (OmpH-like)	gi 432662	P
Cold shock protein CspA	gi 3121924	K
DNA-binding protein H-NS	gi 43078	K
30S ribosomal protein S9	gi 223001	J
ribosomal protein L10	gi 223035	J
50S ribosomal protein L25	gi 405949	J
50S ribosomal protein L18	gi 15803831	J
PilV	gi 18959290	S
DNA-directed RNA polymerase subunit omega	gi 15804190	K
Cold shock-like protein CspG	gi 15800910	K
Thioredoxin TrxA	gi 148071	V
50S ribosomal protein	gi 15803839	J

L29		
Cold shock-like protein CspB	gi 16129516	K
unnamed protein product	gi 42983	S
ribosomal protein L10	gi 223035	J
50S ribosomal protein L24	gi 15803836	J
30S ribosomal protein S6	gi 15804789	J
ribosomal protein S15	gi 223171	J
50S ribosomal protein L25	gi 26108973	J
30S ribosomal protein S16	gi 15803131	J
50S ribosomal protein L18	gi 15803831	J
DNA-binding protein HU- beta	gi 15800170	K
30S ribosomal protein S10	gi 15803848	J

**Tabela 2.** Relatório das proteínas identificadas na preparação de tripsinização *in solução* de APEC MT78, reisolada da interação de 1 h com CEC-32.

<b>Proteína identificada</b>	<b>Acesso no NCBI</b>	<b>Classificação funcional segundo KOG</b>
Type-1 fimbrial protein, A chain	1816487	M
DNA-binding protein HU-alpha	15804591	K
30S ribosomal protein S4	15803823	K
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	26248038	G
enolase; phosphopyruvate hydratase	563868	G
30S ribosomal protein S3	15803841	J
30S ribosomal protein S7	15803854	J
elongation factor G	15803853	J
lipoprotein	223967	I
outer membrane protein A	110641146	M
ribosomal protein L10	223035	J
rplK (L11)	42814	J
50S ribosomal protein L5	15803835	J
pyruvate dehydrogenase subunit E1	15799798	G
50S ribosomal protein L6	15803832	J
50S ribosomal protein L3	15803847	J
30S ribosomal protein S5	15803830	J
30S ribosomal protein S6	133976	J
50S ribosomal protein L7/L12	15804576	J
50S ribosomal protein L15	15803828	J
30S ribosomal protein S13	15803825	J
50S ribosomal protein L20	15802128	J
DNA-directed RNA polymerase subunit omega	15804190	K
50S ribosomal protein L16	15803840	J
50S ribosomal protein L1	281181048	J
30S ribosomal protein S12	15803855	J
phosphoglycerate kinase	15803460	G
50S ribosomal protein L1	15804574	J
ribosomal protein L2	301046088	J
cold shock-like protein	1778540	K

50S ribosomal protein L24	26249897	J
Chain A, Major Cold-Shock Protein From <i>E. coli</i> Solution Nmr Structure	3891780	K
acyl carrier protein	15801211	I
GapA	226343955	G
alkyl hydroperoxide reductase subunit C	15800320	P
30S ribosomal protein S17	15803838	J
protein L9	223572	J
50s Subunit Of 70s Ribosome	34811566	J
30S ribosomal protein S16	15803131	J
H-ns	43078	K
30s ribosomal protein S6	227885424	J
50S ribosomal protein L18	15803831	J
ribosomal protein S15	223171	J
50S ribosomal protein L22	15803842	J
asparagine synthetase A	40998	E
phosphoglyceromutase	15800464	G
outer membrane protein C	168754967	P
Chain F, Structure Of The Regulatory Complex Of <i>E. coli</i> liiglc With Glycerol Kinase	442945	G
phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	15802999	F
50S ribosomal protein L17	15803821	J
bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	15801467	G
50S ribosomal protein L4	15803846	K
30S ribosomal protein S10	15803848	J
50S ribosomal protein L29	15803839	J
nucleoside diphosphate kinase	15803041	F
protein S9	223001	J
glutaredoxin-like protein	993029	P
unnamed protein product	42283	S
putative receptor	15801691	M
50S ribosomal protein L27	15803725	J
ribosome recycling factor	15799854	J
30S ribosomal protein S2	15799851	J
autonomous glycyl radical cofactor GrcA	15803106	G

unnamed protein product	41613	S
50S ribosomal protein L19	15803128	J
unnamed protein product	42377	S
rpoB	42818	K
superoxide dismutase	110644245	P
putative YafB protein	218454967	S

**Tabela 3.** Relatório das proteínas identificadas na preparação de tripsinização em gel de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

<b>Proteína identificada</b>	<b>Acesso no NCBI</b>	<b>Categoria funcional</b>
Type-1 fimbrial protein, A chain	1::FIMA1_ECOLX	M
DNA-binding protein HU-alpha	1::DBHA_ECOLI	K
30S ribosomal subunit protein S4	1::RS4_ECO24	J
Enolase	1::ENO_ECOBW	G
30S ribosomal protein S7	1::RS7_ECO24	J
30S ribosomal protein S3	1::RS3_ECO24	J
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2::gi 26248038	G
Major outer membrane lipoprotein Lpp	1::LPP_ECOLI	I
Outer membrane protein A	2::gi 110641146	M
50S ribosomal protein L10	1::RL10_ECO24	J
50S ribosomal protein L3	1::RL3_ECO24	J
50S ribosomal protein L11	1::RL11_ECO24	J
Elongation factor G	1::EFG_ECOBW	J
Pyruvate dehydrogenase E1 component	1::ODP1_ECO57	G
50S ribosomal protein L15	1::RL15_ECO24	J
50S ribosomal protein L7/L12	1::RL7_ECO24	J
30S ribosomal protein S5	1::RS5_ECO24	J
50S ribosomal protein L5	1::RL5_ECO24	J
30S ribosomal protein S12	1::RS12_ECO24	J
50S ribosomal protein L6	1::RL6_ECO24	J
50S ribosomal protein L20	1::RL20_ECO24	J
50S ribosomal protein L1	1::RL1_ECO24	J
DNA-directed RNA polymerase subunit omega	1::RPOZ_ECOB W	K
50S ribosomal protein L16	1::RL16_ECO24	J
50S ribosomal protein L2	1::RL2_ECO24	J
30S ribosomal protein S6	1::RS6_ECO24	J
Phosphoglycerate kinase	1::PGK_ECOLC	G
Trigger factor	1::TIG_ECOBW	D
Cold shock-like protein CspE	1::CSPE_ECOLI	K

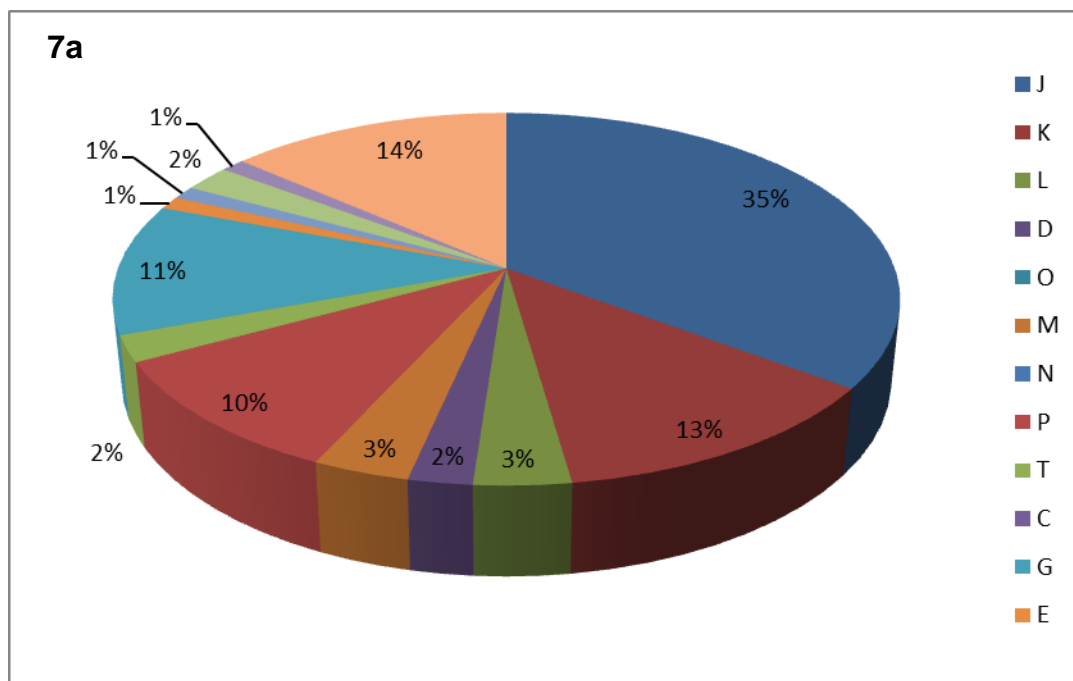
Cold shock protein CspA	1::CSPA_ECOLI	K
Aldehyde-alcohol dehydrogenase	1::ADHE_ECOLI	P
DNA-binding protein H-NS	1::HNS_ECOLI	K
Acyl carrier protein	1::ACP_ECOBW	I
50S ribosomal protein L24	1::RL24_ECO27	J
Outer membrane protein C	1::OMPC_ECOLI	P
30S ribosomal protein S17	1::RS17_ECO24	J
30S ribosomal protein S13	1::RS13_ECO57	J
50S ribosomal protein L18	1::RL18_ECO24	J
50S ribosomal protein L17	1::RL17_ECO24	J
Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA component	1::PTGA_ECOLI	G e T
50S ribosomal protein L22	1::RL22_ECO24	J
2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	1::GPMA_ECOB W	G
30S ribosomal protein S15	1::RS15_ECO24	J
30S ribosomal protein S16	1::RS16_ECO24	J
50S ribosomal protein L9	1::RL9_ECO24	J
Aspartate--ammonia ligase	1::ASNA_ECOBW	E
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	1::AHPC_ECOLI	P
30S ribosomal protein S10	1::RS10_ECO24	J
conserved hypothetical protein	2::gi 187776131	S
Elongation factor P	1::EFP_ECOBW	J
50S ribosomal protein L28	1::RL28_ECO24	J
30S ribosomal protein S1	1::RS1_ECO57	J
Glutaredoxin-4	1::GLRX4_ECO5 7	P
50S ribosomal protein L27	1::RL27_ECO24	J
Ribosome-recycling factor	1::RRF_ECOBW	J
Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	1::PUR7_ECO24	F
30S ribosomal protein S2	1::RS2_ECO27	J
50S ribosomal protein L25	1::RL25_ECO27	J
10 kDa chaperonin	1::CH10_ECO24	D
50S ribosomal protein L19	1::RL19_ECO24	J
DNA-directed RNA polymerase subunit beta	1::RPOB_ECOB W	K

Superoxide dismutase [Mn]	2::gi 26250673	P
30S ribosomal protein S18	1::RS18_ECO24	J
Chaperone protein dnaK	1::DNAK_ECOHS	L
conserved hypothetical protein	2::gi 300935484	S
50S ribosomal protein L6	1::RL6_ECO24	J
50S ribosomal protein L5	1::RL5_ECO24	J
Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	1::AHPC_ECOLI	P
Chaperone protein skp	2::gi 52695972	M
Single-stranded DNA-binding protein	1::SSB_ECOLI	L
50S ribosomal protein L4	1::RL4_ECO24	K
Translation initiation factor IF-3	1::IF3_ECO27	J
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	1::CLPP_ECOHS	N e O
Shikimate kinase 1	1::AROK_ECODH	E
UPF0234 protein yajQ	1::YAJQ_ECOBW	S
Inorganic pyrophosphatase	1::IPYR_ECOLI	Q
UPF0307 protein yjgA	1::YJGA_ECOBW	S
DnaK suppressor protein	1::DKSA_ECOLI	P
Transcription antitermination protein nusG	1::NUSG_ECOLI	K
50S ribosomal protein L13	1::RL13_ECO24	J
Transcription elongation factor greA	1::GREA_ECOLI	K
Co-chaperone protein hscB	1::HSCB_ECOB WO	J
30S ribosomal protein S4	1::RS4_ECO24	K
Ribosome maturation factor rimM	1::RIMM_ECOBW	J
ProP effector	1::PROQ_ECOB W	G, E, P e R
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkpA	1::FKBA_ECO57	J
30S ribosomal protein S9	1::RS9_ECO24	J
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase slyD	1::SLYD_ECOLI	J
D-ribose-binding periplasmic protein	1::RBSB_ECOLI	G
Elongation factor P-like protein	1::EFPL_ECODH	J
Protein grpE	1::GRPE_ECOB W	O
Methionine aminopeptidase	1::AMPM_ECOLI	J

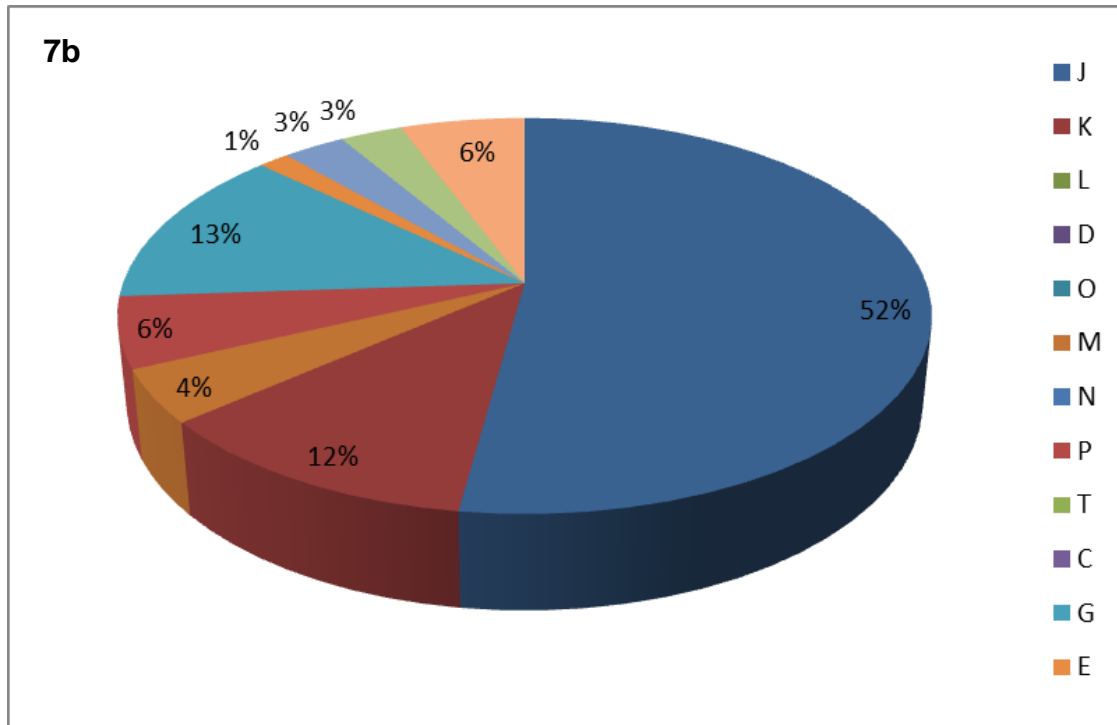


Transcriptional regulatory protein phoP	1::PHOP_ECOLI	K
Uncharacterized protein ybbN	1::YBBN_ECOLI	O
30S ribosomal protein S8	1::RS8_ECO24	K
hypothetical protein	2::gi 218558917	S
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	2::gi 468157	G
putative outer membrane porin protein	2::gi 209919271	S
Elongation factor Tu 1	1::EFTU1_ECO24	J
Maltose-binding periplasmic protein	1::MALE_ECOLI	G
Chaperone surA	1::SURA_ECOLI	M
Replication regulatory protein RepA2	1::REP1_ECOLD	K
unnamed protein product	2::gi 42144	S
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	1::ODP2_ECOLI	G
Glucans biosynthesis protein G	1::OPGG_ECOB W	G
Cold-shock DEAD box protein A	1::DEAD_ECOLI	K
glycosyl transferase [ <i>E. coli</i> ]	2::gi 121292050	G
Pyruvate kinase I	1::KPYK1_ECO57	G
ATP synthase subunit alpha	1::ATPA_ECOBW	C
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	1::PCKA_ECOBW	G
DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	2::gi 15804577	K
Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	1::SYFB_ECOLI	J
Dihydrolipoyl dehydrogenase	1::DLDH_ECOLI	G
Adenylosuccinate synthetase	1::PURA_ECOB W	F
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	1::6PGD_ECOLI	F
Fructose-bisphosphate aldolase class 2	1::ALF_ECOLI	G
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1::RPOA_ECOHS	K
Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	1::FABI_ECOLI	I
Cysteine desulfurase	1::ISCS_ECOBW	E

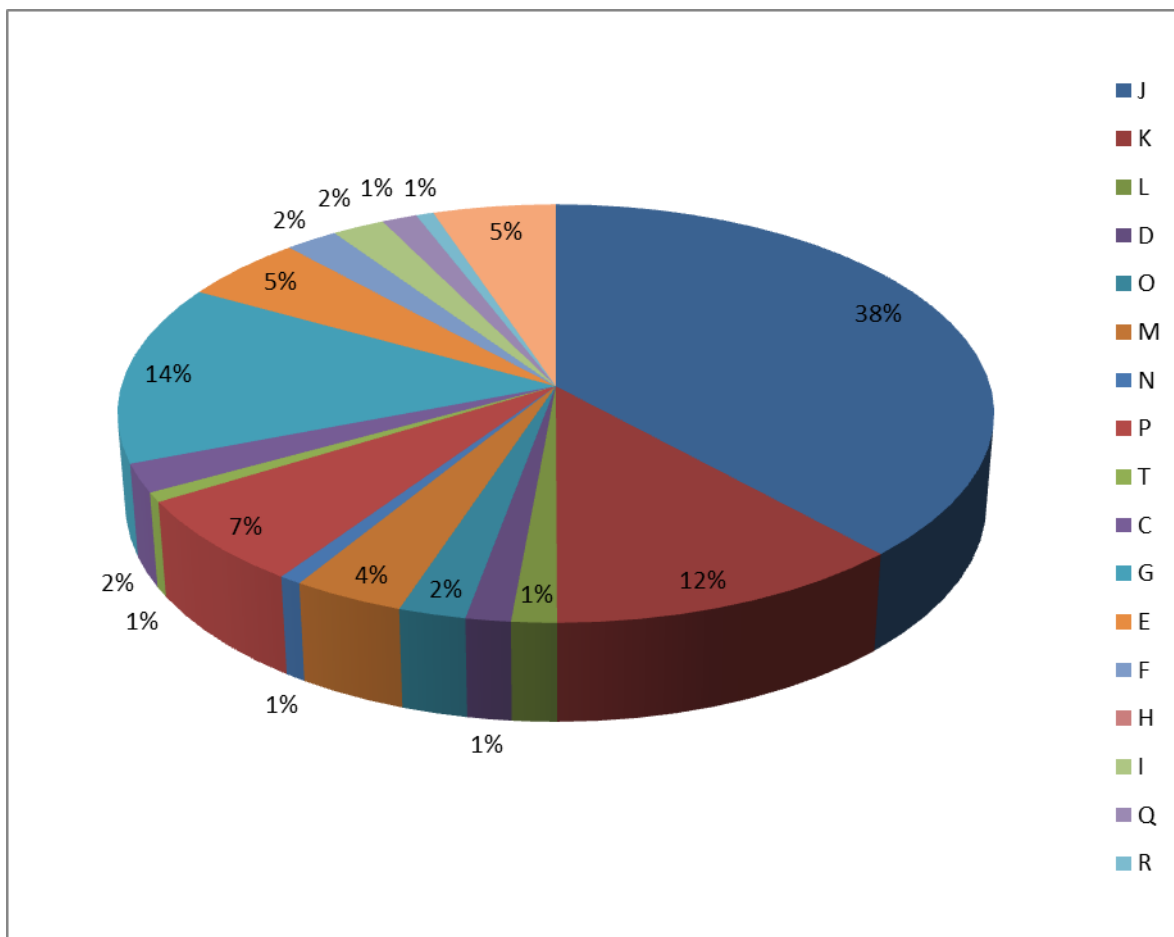
1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	1::HIS4_ECO24	E
ATP synthase subunit beta	1::ATPB_ECOBW	C
Serine hydroxymethyltransferase	1::GLYA_ECOBW	E
KHG/KDPG aldolase	1::ALKH_ECOLI	G
2-dehydro-3-deoxygluconokinase	1::KDGK_ECOLI	G
4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase	1::KDUI_ECOBW	M
Thiol peroxidase	1::TPX_ECOLI	P
S-adenosylmethionine synthase	1::METK_ECOB W	E
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	2::gi 9664314	C
Aspartyl-tRNA synthetase	2::gi 300935841	J
Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC	2::gi 297519079	Q



**Fig. 7. Representação proporcional dos grupos funcionais das proteínas identificadas.** (a) Proteínas de APEC MT78 crescida DMEM e tripsinizadas em gel; (b) proteínas de APEC MT78 recuperada da interação com CEC-32 tripsinizadas em solução; (c) proteínas de *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  crescida em caldo LB e tripsinizadas em gel. Uma proteína pode apresentar mais de uma função biológica. Informações detalhadas das proteínas estão nas Tabelas 1, 2 e 3. Classes funcionais representadas segundo COG: (J) tradução, estrutura robossomal e biogênese; (K) transcrição; (L) replicação, recombinação e reparo; (D) controle do ciclo celular, divisão celular; (O) modificação pós-traducional, chaperonas turnover de proteínas; (M) parede celular, envelope e membrana celular e biogênese; (N) motilidade celular; (P) transporte e metabolismo de íons inorgânicos; (T) mecanismos de transdução de sinal; (C) produção e conversão de energia; (G) transporte e metabolismo de carboidratos; (E) transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) metabolismo e transporte de nucleotídeo; (H) metabolismo e transporte de coenzimas; (I) metabolismo e transporte de lipídios; (Q) biossíntese e transporte de metabólitos secundários; (R) função geral apenas predita; (S) função desconhecida. As proteínas podem ser classificadas em 1 ou mais função.



**Fig. 7. Representação proporcional dos grupos funcionais das proteínas identificadas.** (a) Proteínas de APEC MT78 crescida DMEM e tripsinizadas em gel; (b) proteínas de APEC MT78 recuperada da interação com CEC-32 tripsinizadas em solução; (c) proteínas de *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  crescida em caldo LB e tripsinizadas em gel. Uma proteína pode apresentar mais de uma função biológica. Informações detalhadas das proteínas estão nas Tabelas 1, 2 e 3. Classes funcionais representadas segundo COG: (J) tradução, estrutura robossomal e biogênese; (K) transcrição; (L) replicação, recombinação e reparo; (D) controle do ciclo celular, divisão celular; (O) modificação pós-traducional, chaperonas turnover de proteínas; (M) parede celular, envelope e membrana celular e biogênese; (N) motilidade celular; (P) transporte e metabolismo de íons inorgânicos; (T) mecanismos de transdução de sinal; (C) produção e conversão de energia; (G) transporte e metabolismo de carboidratos; (E) transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) metabolismo e transporte de nucleotídeo; (H) metabolismo e transporte de coenzimas; (I) metabolismo e transporte de lipídios; (Q) biossíntese e transporte de metabólitos secundários; (R) função geral apenas predita; (S) função desconhecida. As proteínas podem ser classificadas em 1 ou mais função.



**Fig. 7. Representação proporcional dos grupos funcionais das proteínas identificadas.** (a) Proteínas de APEC MT78 crescida DMEM e tripsinizadas em gel; (b) proteínas de APEC MT78 recuperada da interação com CEC-32 tripsinizadas em solução; (c) proteínas de *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  crescida em caldo LB e tripsinizadas em gel. Uma proteína pode apresentar mais de uma função biológica. Informações detalhadas das proteínas estão nas Tabelas 1, 2 e 3. Classes funcionais representadas segundo COG: (J) tradução, estrutura robossomal e biogênese; (K) transcrição; (L) replicação, recombinação e reparo; (D) controle do ciclo celular, divisão celular; (O) modificação pós-traducional, chaperonas turnover de proteínas; (M) parede celular, envelope e membrana celular e biogênese; (N) motilidade celular; (P) transporte e metabolismo de íons inorgânicos; (T) mecanismos de transdução de sinal; (C) produção e conversão de energia; (G) transporte e metabolismo de carboidratos; (E) transporte e metabolismo de aminoácidos; (F) metabolismo e transporte de nucleotídeo; (H) metabolismo e transporte de coenzimas; (I) metabolismo e transporte de lipídios; (Q) biossíntese e transporte de metabólitos secundários; (R) função geral apenas predita; (S) função desconhecida. As proteínas podem ser classificadas em 1 ou mais função.

## 6 Discussão e Conclusões

A patogênese de infecções extra-intestinais em aves causadas por *E. coli* patogênicas aviárias é um processo multifatorial que depende de uma grande variedade de fatores de virulência. Os fatores de virulência já conhecidos, e possivelmente outros ainda desconhecidos, definem a virulência de uma certa cepa e portanto definem o grau da sintomatologia apresentada no hospedeiro imunocompetente. Basicamente, esses fatores estão envolvidos com (1) a habilidade de adesão da bactéria ao epitélio respiratório da ave mediada pelas fímbrias, (2) resistência da bactéria às defesas imunológicas do hospedeiro, (3) multiplicação da bactéria em líquidos biológicos através da expressão de sideróforos e (4) a habilidade de produzir efeitos citotóxicos (revisado em DZIVA & STEVENS, 2008). Porém, os genes até então associados à virulência de APEC não respondem completamente pelos mecanismos patogênicos empregados pela bactéria.

Estudos sobre a interação patógeno-hospedeiro na colibacilose aviária e a elucidação dos mecanismos patogênicos empregados por APEC estão apenas no seu começo. Métodos de cultura celular *in vitro* vêm sendo conduzidos em uma gama de linhagens celulares (LA RAGIONE *et al.*, 2000; GOPHNA *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2002; GERMON *et al.*, 2005; CHANTELOUP *et al.*, 2010), impedindo comparações inter-laboratoriais e conclusões posteriores. Porém, MATTER e colaboradores (2010), usando a linhagem de fibroblastos de galinha CEC-32, mostraram que a invasão é um fenótipo variável entre as cepas APEC e que a cepa MT78 destaca-se por ser altamente invasiva. O trabalho ainda sugere o uso da linhagem CEC-32 como um bom modelo para estudos sobre os mecanismos de invasão de células não fagocitárias. A padronização dos ensaios de interação é crucial para evitar o uso excessivo de modelos animais e permitir a compreensão dos eventos iniciais da invasão celular por APEC MT78.

Neste trabalho de Mestrado, confirmou-se o modelo de interação de CEC-32 e investigou-se a natureza dessa interação através de técnicas de microscopia. No ensaio de associação de MT78 a CEC-32 em MI de 20 bactérias/célula, observamos uma média de 10 bactérias aderidas/célula, enquanto MATTER *et al.* (2010)

observaram média de 6 bactérias aderidas/célula. Dada a grande variabilidade para esse tipo de experimento, os valores podem ser considerados muito próximos. O número de bactérias associadas aumentou proporcionalmente com o aumento da multiplicidade de infecção (Fig. 1b). Já o tempo de incubação pareceu não influenciar o índice de associação de APEC MT78 a CEC-32, pois entre 1 h (este trabalho) e 2 h (MATTER *et al.*, 2010) pós-infecção, o índice se manteve bastante próximo.

A análise fenotípica da associação revelou que APEC MT78 tem um padrão de adesão localizada (Fig. 2 e 3a), segundo distinção proposta por SCALETSKI e colaboradores (1984). As bactérias foram observadas em pequenos grupos, que variam de 1 a 3 grupos por célula, e esses grupos podem variar em número de bactérias por grupo. Quando infectadas com MI de 20 UFC/célula, os grupos pareceram localizar-se em sítios específicos na célula, sugerindo que os receptores relacionados com a adesão de MT78 não estão distribuídos igualmente na superfície dos fibroblastos CEC-32. SILVEIRA e colaboradores (2002) relataram que, dentre 80 cepas patogênicas de APEC testadas, o padrão de adesão localizada a células KPCC de origem aviária foi observado para a maioria das cepas. O mesmo padrão de associação também foi observado para a APEC IMT5155, de patogenicidade semelhante a MT78. A cepa não-patogênica APEC IMT5104, por sua vez, apresentou um padrão de adesão difusa, assim como a cepa de *E. coli* K12 (dados não mostrados). Mais estudos serão necessários para elucidar se o padrão de adesão está relacionado com a patogenicidade de APEC. Para outros patótipos de *E. coli* diarréigênicas, a formação de microcolônias durante a adesão é um mecanismo patogênico bem elucidado: EPEC adere a células epiteliais intestinais formando microcolônias através de estruturas chamadas fímbrias formadoras de agregados ou BFP (“*bundle-forming pili*”), em um padrão de adesão localizada que aumenta a sua resistência às defesas do hospedeiro; e EAEC tem como característica fenotípica a adesão agregativa e a formação de biofilmes na superfície dos enterócitos, que promovem a persistência das colônias no epitélio intestinal (revisado em TORRES *et al.*, 2005; CROXEN & FINLAY, 2010).

Pode-se observar por microscopia eletrônica que a APEC MT78 formou microcolônias que parecem estar embebidas em uma matriz extracelular com características de biofilme (Fig. 3b). A formação desses agregados é independente da

interação com a célula-alvo, porém é dependente da viabilidade da bactéria, pois quando inativada pelo calor a APEC MT78 não formou as mesmas estruturas (dados não-mostrados). As mesmas fibras que ligam uma bactéria a outra, ligam uma bactéria individualmente a célula-alvo. Embora não necessite do contato da célula para formar tais estruturas, a aproximação da imagem sugere que MT78 poderia favorecer-se delas no processo de invasão (Fig. 3c e 3d), retraindo-as quando já iniciado o processo invasivo (Fig. 3e).

As estruturas formadas por APEC MT78 são claramente diferentes de outras estruturas de superfície já identificadas, como Fímbria tipo 1 e curli. O diâmetro estimado dessas estruturas foi de 70 nm, significativamente mais grossas que flagelo (aprox.. 20 nm), Fímbria tipo 1 (aprox. 7 nm) e fímbrias formadoras de agregados (aprox. 7 nm), enquanto que o comprimento (0,7-1  $\mu\text{m}$ ) é significativamente mais curto que flagelo (5-10  $\mu\text{m}$ ) (GIRON *et al.*, 1991). As estruturas observadas são típicas da matriz extracelular característica de biofilmes, e a hipótese de que APEC MT78 esteja formando biofilmes sobre a célula-alvo deverá ser investigada. De fato, alguns autores já demonstraram a capacidade de formação de biofilmes por cepas de APEC: SKYBERG e colaboradores (2007) concluíram que a capacidade de formação de biofilme em superfícies plásticas por cepas APEC patogênicas está relacionada às condições de privação de nutrientes; WANG e colaboradores (2011) observaram uma interessante associação entre o gene *ibeA*, uma invasina, e a formação de biofilmes por uma cepa APEC invasiva em células de fibroblastos aviários DF-1. A ausência do gene *ibeA* na cepa APEC DE205B levou à diminuição da capacidade invasiva e diminuição da formação de biofilme. Essas características puderam ser restauradas quando o gene deletado foi complementado na cepa APEC. Em conjunto, esses dados apontam que biofilmes são relevantes na virulência de APEC.

A maioria das bactérias invasivas entra em epitélios pela indução de rearranjos dos filamentos de actina, que estão concentrados logo abaixo da membrana plasmática da célula-hospedeira (revisado em CROXEN & FINLAY, 2010). Quanto aos mecanismos e fatores de virulência envolvidos na invasão de APEC, eles têm sido estudados pela adição prévia de inibidores do citoesqueleto durante o ensaio de proteção a gentamicina. MATTER e colaboradores (2010) relataram que a adição de



citocalasina D, um inibidor de polimerização de actina, ao meio de infecção inibiu a invasão de APEC MT78 em CEC-32. CHANTELOUP e colaboradores (2010) também investigaram o envolvimento de rotas endocíticas na invasão de BEN2908, ou MT78<sup>NalR</sup>. Novamente foi observado que a adição de citocalasina D inibiu a invasão de APEC em hepatócitos aviários da linhagem LMH. Além disso, a adição de um inibidor de formação de endossomos cobertos por clatrina, a clorpromazina, ao meio de infecção também reduziu significativamente a invasão dessa cepa APEC, indicativa do envolvimento de clatrininas e formação de vacúolos na invasão. Nossos resultados corroboram de maneira bastante clara para o envolvimento da polimerização de actina na invasão de MT78. Através da investigação por MEV pudemos mostrar pela primeira vez rearranjos localizados da superfície da célula eucariótica, caracterizados pela formação de estruturas lamelipodiais e filopodiais induzidas pela bactéria viável quando aderida à célula hospedeira. Esses rearranjos são muito similares aos induzidos por *Yersinia* durante a sua invasão em células eucarióticas, bem como a sensibilidade a clorpromazina (FINLAY & FALKOW, 1988). Porém, os mecanismos envolvidos na polimerização de actina e formação do foco de entrada desses patógenos são provavelmente diferentes.

Os processos moleculares envolvidos na invasão de APEC MT78 parecem envolver a liberação de proteínas efetoras na célula hospedeira ou no meio, pois quando inativada pelo calor a bactéria não é capaz de associar-se à célula-hospedeira e conseqüentemente não a invade. No entanto, não pudemos concluir se essas proteínas são sintetizadas pelo contato com as células-alvo ou se elas encontram-se pré-sintetizadas e são liberadas quando do contato. Mas, a julgar pelo experimento de inativação da bactéria, essas proteínas efetoras não se encontram constitutivamente na membrana de APEC MT78.

A disponibilidade da sequência genômica de uma cepa APEC sorogrupo O1 (JOHNSON *et al.*, 2007) expandiu as oportunidades de investigação das bases moleculares da invasão. A seqüência de outra APEC, a cepa  $\chi$ 7122, também deverá estar disponível em breve (C. DOZOIS & R. CURTISS, comunicação pessoal). Isso nos permitiu vislumbrar a proteômica para o estudo da interação de APEC MT78 e células eucarióticas. Contudo, experimentos como esses necessitam uma avaliação ou

otimização dos métodos usados para a preparação da amostra para proteômica, bem como uma definição consistente do desenho experimental utilizado. Sendo assim, nessa segunda etapa do trabalho propusemos padronizar as metodologias de extração de proteínas e recuperação de bactérias associadas a células eucarióticas. Para fins de comparação, testamos 4 metodologias: Prensa de French, sonicação, ciclos de congelamento-descongelamento, e lise por pérolas de vidro.

Na prensa de French, as células são expostas a alta pressão (acima de 40 mil psi), resultando em uma alta pressão intracelular. As células bacterianas se desintegram na mudança de pressão quando a amostra é dispensada através do tubo de saída e encontra a pressão atmosférica. Embora a prensa de French seja usada com bastante sucesso (CORBIN *et al.*, 2003), o uso desse equipamento para amostras de volumes inferiores a 15 mL, que é nosso caso, não se mostrou eficiente. Outra dificuldade que tivemos foi o fato dos ajustes de pressão serem feitos manualmente. Assim como demonstrado por SCHAWARZ e colaboradores (2007) para *Clostridium*, uma bactéria Gram-positiva, demonstramos aqui que a sonicação é a técnica mais eficiente para rompimento de células e extração de proteínas totais também de Gram-negativos, neste caso *E. coli*. Apesar de apresentar rendimento bruto bem semelhante a outras técnicas utilizadas, a sonicação tem como vantagem um maior número de bandas proteicas visualizadas por SDS-PAGE.

O enriquecimento de células bacterianas isoladas das células eucarióticas infectadas é crítico para a identificação de proteínas funcionalmente importantes que estão relacionadas à adesão e invasão de APEC MT78 a fibroblastos CEC-32. Por essa razão, optamos por utilizar a MI de 200, ao invés de 20 (Fig. 5). É importante também que as células bacterianas estejam intactas para que sejam posteriormente lisadas para a análise por espectrometria de massas. Para obtermos a maior concentração de proteínas bacterianas possível, analisamos o rendimento obtido em duas técnicas diferentes. A primeira técnica, do gradiente de sacarose, foi adaptada de técnicas utilizadas para isolamento de organelas celulares e vacúolos contendo patógenos (FUGIER *et al.*, 2009; AL DAHOUK *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2006). A segunda técnica testada, da solubilização diferencial, foi utilizada no isolamento de bactérias em co-cultivo para extração de RNA (ERIKSSON *et al.*, 2003), e está baseada na maior

resistência a detergentes das células procarióticas em comparação às células eucarióticas animais.

Para identificar proteínas-chave na interação com células CEC-32, isolamos com sucesso células intactas de APEC MT78 associadas a células de fibroblastos pelo método de solubilização diferencial de membranas (Fig. 6). Esse método já havia sido utilizado para preparação de amostras de RNA (ERIKSSON *et al.*, 2003) e de proteínas (Shi *et al.*, 2006) de bactérias internalizadas em macrófagos, porém não havia sido mostrado o uso de tal técnica para o isolamento de bactérias associadas.

Diversas novas tecnologias para o estudo de proteômica global de microrganismos vêm sendo desenvolvidas para superar as limitações do método tradicional de escolha, o gel bidimensional. O primeiro método tentado neste trabalho foi o pré-fracionamento da amostra com gel unidimensional, seguido da tripsinização *em gel* de 10 fatias da amostra. Apesar de apresentar uma boa distribuição das proteínas identificadas em suas categorias funcionais e contemplar a identificação de proteínas de membrana de APEC MT78 como OmpC e OmpA, o número de proteínas identificadas foi bastante reduzido quando comparado a outros trabalhos de análises globais (SHI *et al.*, 2006) e mesmo ao número de proteínas preditas no genoma de APEC (JOHNSON *et al.*, 2007). No entanto, como se trata de uma amostra obtida de cultura pura de APEC MT78, pode-se presumir que a simples presença da proteína OmpA não está relacionada com a invasão dessa cepa. OmpA já foi demonstrada ser importante para a invasão de outra ExPEC, a NMEC, em células endoteliais humanas HBMEC (WANG & KIM, 2002).

Tentamos ainda um método mais direto de análise proteômica, o “*shotgun*”, para tentar superar o problema do baixo número de proteínas identificadas. Nesse caso, a amostra obtida de tripsinização *em solução* sem pré-fracionamento foi usada para identificar proteínas da interação bactéria-célula. Novamente, a adaptação dessa técnica ao nosso modelo de estudo provou ser problemática, pois não houve melhora na identificação de proteínas.

Por último tentamos novamente o pré-fracionamento da amostra em SDS-PAGE e corte da canaleta em 30 fatias, ao invés de 10. Essa abordagem provou ser a de maior sucesso em nossas condições de análise, visto que foi possível identificar 130

proteínas de *E. coli* K12 representativas de diversas classes funcionais de *E. coli* (Fig. 7c).

De maneira geral, as proteínas identificadas até o momento estão relacionadas à síntese proteica e proteínas ribossômicas S e L; fatores de alongamento, como Tu e Ts; proteínas relacionadas ao metabolismo energético, como a enolase, fosfoglicerocinase, piruvato-cinase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bem como proteínas que respondem a um estímulo ambiental, tais como as proteínas de choque térmico (Tabelas 1, 2 e 3). É possível que essa última abordagem apresente bons resultados para amostras mais complexas, como as utilizadas neste estudo. Ainda, o uso de detergentes em baixas concentrações para solubilizar proteínas de membrana bacteriana insolúveis na amostra poderia enriquecer o número de proteínas de interesse.

Contudo, trabalhos que obtiveram bastante sucesso em análises de grande escala utilizaram abordagem de pré-fracionamento do extrato proteico por cromatografia líquida multidimensional seguida “*in line*” de espectrometria de massas (*Multidimensional protein identification technology- MudPIT*) (SHI *et al.*, 2006). A abordagem MudPIT tem como vantagem o grande número de peptídeos identificados por um tempo de análise bastante rápido, além de ter alta reprodutibilidade (WASHBURN *et al.*, 2001). O fato do equipamento de cromatografia multidimensional estar acoplado ao espectrômetro de massas também faz com que a perda de amostra seja bastante reduzida, adequada a análises como a deste trabalho, no qual a obtenção de bactérias internalizadas é um fator limitante.

De maneira similar a outros estudos de análise global, a proteômica pode apresentar vários gargalos durante o seu desenvolvimento. Esses incluem a necessidade de se obter replicatas biológicas e técnicas reprodutíveis, a padronização das análises instrumentais para obter o melhor rendimento do equipamento utilizado e o cuidado no desenho experimental antes de realizar o experimento. Como resultado, esses cuidados simplificam e permitem a obtenção de resultados confiáveis que levam a novas descobertas.

Desse modo, neste trabalho de mestrado, foi demonstrado que o modelo de interação APEC MT78 a CEC-32 é reprodutível, podendo ser estudado em análises

como a proteômica. O tempo de interação escolhido abrange bactérias aderidas e iniciando seu processo de invasão na célula-alvo, sendo, portanto, o tempo experimental ideal para a identificação de proteínas-chave na invasão. O reisolamento das células bacterianas pode ser realizado com sucesso neste trabalho, de maneira que a contaminação por restos celulares foi bastante minimizada, a julgar pelos dados de MET. Adicionalmente, mostramos a formação de estruturas bacterianas que lembram matriz de biofilmes que são transientes durante o processo de adesão e invasão da APEC MT78 a CEC-32, agregando mais uma informação para a patogênese da colibacilose aviária.

## 7 Perspectivas

As perspectivas imediatas deste projeto são:

- Criar o banco de dados contendo o genoma de APEC O1 e de *Gallus gallus* no software Mascot para futuras análises dos dados proteômicos;
- Analisar os dados proteômicos qualiquantitativos de proteínas de superfície obtidas da associação (1 h) e invasão (2 h) de APEC MT78 e CEC-32 por MudPIT;
- Finalizar as análises microscópicas da invasão por microscopia eletrônica de transmissão;
- Realizar os testes para detecção de biofilmes na interação de APECMT78 e CEC-32.

## 8 Referências Bibliográficas

- ADKINS, J.N., MOTTAZ, H.M., NORBECK, A. D., GUSTIN, J.K., RUE, J., CLAUSS, T. R. W., PURVINE, S.O., RODLAND, K.D., HEFFRON, F. & SMITH, R.D. Analysis of the *Salmonella typhimurium* Proteome through Environmental Response toward Infectious Conditions. *Molecular & Cellular Proteomics* 5:1450–1461, 2006.
- AL DAHOUK, S., JUBIER-MAURIN, V., SCHOLZ, H.C., TOMASO, H., KARGES, W., NEUBAUER, H. & KÖHLER, S. Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection. *Proteomics* (8): 3862-3870, 2008.
- ANTÃO, E.M., WIELER, L. H. & EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 1 (22): 1-12, 2009.
- AVISITE- O PORTAL DA AVICULTURA NA INTERNET. Disponível em <[www.avisite.com.br](http://www.avisite.com.br)> Acesso em: janeiro 2011.
- BAE, S.M., YEON, S.M., KIM, T.S. & LEE, K.J. The Effect of Protein Expression of *Streptococcus pneumoniae* by Blood. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (6): 703-708, 2006.
- BAORTO, D.M, GAO, Z., MALAVIYA, R., DUSTIN, M.L., VAN DER MERWE, A., LUBLIN, D.M & ABRAHAM, S.N. Survival of FimH-expressing *enterobacteria* in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature*. 389 (6651):636-9, 1997.
- BASTIANI, M., VIDOTTO, M.C. & F. HORN. An avian pathogenic *Escherichia coli* isolate induces caspase 3/7 activation in J774 macrophage. *FEMS Microbiol. Lett.* 253 : 133-140, 2007
- CAZA, M.F.L., MILOT, S., & DOZOIS, C.M. Specific Roles of the *iroBCDEN* Genes in Virulence of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 Strain and in Production of Salmochelin. *Infect and Immun*, 76 : 3539–3549, 2008.
- CHANTELOUP, A, PORCHERON, G. L., DELALEU B.B, GERMON, P. A, SCHOULER C. A. MOULIN-SCHOULEUR, M.A & GILOT, P. The extra-intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly. *Vet Microbiol.* 27; 147 (3-4):435-9, 2011.

- CHOUIKHA, I., GERMON, P., BREE, A., GILOT, P., MOULIN-SCHOULEUR, M. & SCHOULER, C. A *selC*-Associated Genomic Island of the Extraintestinal Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain BEN2908 Is Involved in Carbohydrate Uptake and Virulence. *J Bacteriol*, 977–987, 2006.
- COIRAS, M., CAMAFEITA, E., LOPEZ-HUERTAS, M.R., CALVO, E., LOPEZ, J.A. & ALCAMI, J. Application of proteomics technology for analyzing the interactions between host cells and intracellular infectious agents. *Proteomics* 8:852-, 2008.
- CONGLI, Y., YANG XIAOWEI C, ZHIBIAO, Y., NINGYU, Z., SHENBO, Z., PEIXING, H.D., XIAOFENG, G. E, CHENGRONG, Y. F., CONGBIN, Y., JIANGUO, Z., LI, C. & XIUGUO, H. Proteomic study of *Mycoplasma suis* using the gel-based shotgun strategy. *Vet Microbiol* 142: 303–308, 2010.
- CORBIN, R.W., PALIY O., YANG, F., SHABANOWITZ, J., PLATT, M., LYONS C.E., JR., ROOT, K., MCAULIFFE, J., JORDAN, M.I., KUSTU, S., SOUPENE, E. & HUNT, D.F. Toward a protein profile of *Escherichia coli*: Comparison to its transcription profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (16): 9232–9237, 2003
- CROXEN M. A. & FINLAY B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature*, 8 : 20-38, 2010.
- DE GODOY, L.M.F., OLSEN, J.V., COX, J., NIELSEN, M. L., HUBNER, N.C., FROHLICH, F., WALTHER, T.C. & M. MANN. Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature* 455(30): 1251-1255, 2008.
- DHO, M. & LAFONT, J. P. *Escherichia coli* Colonization of the Trachea in Poultry: Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens. *Avian Diseases*, 26 (4) : 787-797, 1982.
- DHO-MOULIN, M., FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299-316, 1999.
- DJORDJEVIC, S. P., CORDWELL, S.J., DJORDJEVIC, M.A, WILTON, J. & MINION, F.C. Proteolytic Processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* Cilium Adhesin. *Infect Immun* 72: 2791-2802, 2004
- DOBRINDT, U. & HACKER, J. Targeting virulence traits potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Curr Op Microbiol* 11:409–413, 2008.



- DOZOIS C.M., DHO-MOULIN, M., BRÉE, A., FAIRBROTHER, J.M., DESAUTELS, C. & CURTISS III, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. *Inf. Immun.* 68:4145–4154, 2000.
- DOZOIS, C. M., DAIGLE, F. & CURTISS, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (1): 247-252, 2003.
- DOZOIS, C. M., DHO-MOULIN, M., BRÉE, A., FAIRBROTHER, J. M., DESAUTELS, C. & CURTISS, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect Immun*, 68 (7):4145-4154, 2000.
- DZIVA, F. & STEVENS, M.P. COLIBACILLOSIS IN POULTRY: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37(4):355-366, 2008.
- ERIKSSON, S., LUCCHINI, S., THOMPSON, A., RHEN, M. & HINTON, J.C.D. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47 (1), 103–118, 2003.
- EWERS, C., ANTÃO, E. M., DIEHL, I., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Intestine and environment of the chicken as a reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Applied Environ Microbiol*, 74 (1): 184-192, 2009.
- EWERS, C., JANSSEN, T., KIESSLING, S., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol*, 104: 91-101, 2004.
- EWERS, C., JANSSEN, T., KIESSLING, S., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 49: 269-273, 2005.
- EWERS, C., LI, G., WILKING, H. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *E. coli*: How closely related they are? *Int. J. Med. Microbiol.* 297:163-176, 2007.
- FERREIRA, A. J. & T. KNÖBL. Colibacillose Aviária. In: BERCHIERI, A., MACARI, M., Doenças das Aves. Campinas: FACTA, P. 197-207, 2000.

- FINLAY, B. B. & FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (2): 136-169, 1997.
- FINLAY, B.B. & FALKOW, S. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholera-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie* 70 : 1089-1099, 1989.
- FRIIS, L.M., C. PIN, B.M. PEARSON & J.M. WELLS. In vitro cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *J Microbiol Methods* 61: 145–160, 2005.
- FUGIER, E., SALCEDO, S.P., DE CHASTELLIER, C., POPHILLAT, M., MULLER, A., ET AL. The Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and the Small GTPase Rab 2 Are Crucial for *Brucella* Replication. *PLoS Pathog* 5(6): e1000487, 2009.
- GERMON, P., CHEN, Y., HE, L., BLANCO, J. E., BRÉE, A., SCHOULER, C., HUANG, S. & MOULIN-SCHOULEUR, M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol*, 151: 1179-1186, 2005.
- GIRON, J.A., HO, A.S.Y. & SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254: 710-713, 1991.
- GOPHNA, U., BARLEV, M., SEIJFFERS, R., OELSCHLAGER, T. A., HACKER, J. & RON, E. Z. Curli Fibers Mediate Internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic Cells. *Infect Immun*, 69 (4): 2659–2665, 2001.
- HAN, M.J. & LEE, S. Y. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future perspectives. *Microbiol Mol Biology Reviews*. 70: 362-439. 2006.
- HERREN, C. D., MITRA, A., PALANIYANDI, S. K., COLEMAN, A., ELANKUMARAN, S. & MUKHOPADHYAY, S. The BarA-UvrY Two-Component System Regulates Virulence in Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78:K80:H9. *Infect Immun* 74: 4900–4909, 2006.
- JOHNSON, T.L, S. KARIYAWASAM, Y. WANNEMUEHLER, P. MANGIAMELE, S.J. JOHNSON, C. DOETKOTT, J.A. SKYBERG, A.M. LYNNE, J.R. JOHNSON & L.K. NOLAN. Genome Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1:H7 Shares Strong Similarities with Human ExPEC Genomes. *J. Bacteriol.* 189:3228-3236, 2007.

- KAPER, J. B., NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, 2: 123-140, 2004
- KHEMIRI, A., A. GALLAND, D. VAUDRY, P. CHAN TCHI SONG, H. VAUDRY, T. JOUENNE & P. COSETTE. Outer-membrane proteomic maps and surface-exposed proteins of *Legionella pneumophila* using cellular fractionation and fluorescent labeling. *Anal Bioanal Chem* 390:1861–1871,
- LA RAGIONE, R.M., COOLEY, W.A. & WOODWARD, M.J. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J Med Microbiol* 49 : 327338, 2000a.
- LI, G., LATURNUS, C., EWERS, C. & WIELER, L. H. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature- tagged mutagenesis. *Infect Immun*, 73: 2818-2827, 2005.
- MAPA – Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: janeiro 2011.
- MATTER, L.B., N.L. BARBIERI, M. NORDHOFF, C. EWERS & F. HORN. Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts. *Vet Microbiol* 24;148 (1):51-9, 2011.
- MELLATA, M., M. DHO-MOULIN, C.M. DOZOIS, R. CURTISS III, B. LEHOUX & J.M. FAIRBROTHER. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun*. 71:494-503, 2003.
- MELLATA, M., AMEISS, K., MO, H. & R.CURTISS III. Characterization of the Contribution to Virulence of Three Large Plasmids of Avian Pathogenic *Escherichia coli* \_7122 (O78:K80:H9). *Infect Immun*, 78:1528–1541, 2010.
- MELLATA, M., J.W. TOUCHMAN & R. CURTISS III. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic x7122 (O78:K80:H9). *PLoS ONE* 4(1): E4232, 2009.
- MOTTAZ-BREWER, H.M., A.D. NORBECK, J.N. ADKINS, N.P. MANES, C. ANSONG, L. SHI, Y. RIKIHISA, T. KIKUCHI, S.W. WONG, R.D. ESTEP, F. HEFFRON, L. PASATOLIC & R.D. SMITH. Optimization of Proteomic Sample Preparation Procedures for

- Comprehensive Protein Characterization of Pathogenic Systems. *J. Biomol. Tech.* 19:285–295, 2008.
- MOULIN-SCHOULEUR, M., C. SCHOULER, P. TAILLIEZ, M.-R. KAO, A. BRÉE, P. GERMON, E. OSWALD, J. MAINIL, M. BLANCO & J. BLANCO. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J. Clin. Microbiol.* 44:3484-3492, 2006.
- MULVEY, M. A., Y. S. LOPEZ-BOADO, C. L. WILSON, R. ROTH, W. C. PARKS, J. HEUSER & S. J. HULTGREN. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282:1494-1497, 1998.
- PACE, F., NAKAZATO, G., PACHECO, A., DE , 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. *Infect Immun.* 78 (12):4990-8, 2010.
- PINTO, P.M., KLEIN, C.S., ZAHA, A. & FERREIRA, H.B. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Science* 7:45, 2009.
- PINTO, P.M., G. CHEMALE, L.A. DE CASTRO, A.P.M. COSTA, J.D. KICH, M.H. VAINSTEIN, A. ZAHA & H.B. FERREIRA. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet. Microbiol.* 121:83-93, 2007.
- PIZARRO-CERDÁ, J. & COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 124(4), 715-727, 2006.
- POURBAKSH, S.A., M. BOULIANNE, B. MARINEAU-DOIZE & J.M. FAIRBROTHER. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet. Microbiol.* 58:195-213, 1997b.
- POURBAKSH, S.A., M. BOULIANNE, B. MARINEAU-DOIZE, C.M. DOZOIS,, C. DESAUTELS & J.M. FAIRBROTHER. Dynamics of *Escherichia coli* infections in experimentally inoculated chickens. *Avian Diseases*, 41: 221-233, 1997c.
- POURBAKSH, S.A., M. DHO-MOULIN, A. BREÉ, C. DESAUTELS, B. MARINEAU-DOIZE, J.M. FAIRBROTHER. Localization of the in vivo expression of P and F1

- fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 22:331-341, 1997a.
- RAMIREZ, R.M., ALMANZA, Y., GARCIA, S. & HEREDIA, N. Adherence and invasion of avian pathogenic *Escherichia coli* to avian tracheal epithelial cells. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1019–1023, 2009.
- REESE, S.A., DALAMANIA, G. & KASPERS, B. The avian lung-associated immune system: a review. *Vet. Res.* 37 (2006) 311–324.
- RODRIGUES-SIEK, K. E., GIDDINGS, C. W., DOETKOT, C., JOHNSON, T. J., FAKHR, M. K. & NOLAN, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 151: 2097-2110, 2005a
- RODRIGUES-SIEK, K. E., GIDDINGS, C. W., DOETKOT, C., JOHNSON, T. J., & NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* 36: 241–256, 2005b.
- RON, E.Z. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr Opin Microbiol* 9 (1 ):28-32, 2006.
- RUSSO, T. A. & JOHNSON, J. R. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad E coli”. *J Lab Clin Med* 139:155-62, 2002.
- RUSSO, T. A. & JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microb and Infect* 5: 449–456, 2003.
- RUSSO, T. A. & JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extra-intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J of Infect Diseases*, 181: 1753-1754, 2000.
- SABRI, M., LE VEILLE, S. & DOZOIS, C. M. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 152: 745-758, 2006.
- SCALTELTSKY, I.A., SILVA, M.L.M. & TRABULSI, L.R. Distintive patterns of adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 45(2): 534-536, 1984.
- SCHOULER, C., KOFFMANN, F., AMORY, C., LEROY-SÉTRIN, S., MOULIN-SCHOULEUR, M. Genomic subtraction for the identification of putative new

- virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. *Microbiol* 150 (9):2973-84, 2004.
- SHEVCHENKO, M. WILM, O. VORM & M. MANN. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68:850-858, 1996.
- SHI, L., J.N. ADKINS, J.R. COLEMAN, A.A. SCHEPMOES, A. DOHNKOVA, H.M. MOTTAZ, A.D. NORBECK, S.O. PURVINE, N.P. MANES, H.S. SMALLWOOD, H. WANG, J. FORBES, P. GROS, S. UZZAU, K.D. RODLAN, F. HEFFRON, R.D. SMITH & T.C. SQUIER. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem* 281:29131-29140, 2006.
- SHI, L., S.M. CHOWDHURY, H.S. SMALLWOOD, H. YOON, H.M. MOTTAZ-BREWER, A.D. NORBECK, J.E. MCDERMOTT, T.R.W. CLAUSS, F. HEFFRON, R.D. SMITH & J.N. ADKINS. Proteomic investigation of the time course responses of RAW 264.7 macrophages to infection with *Salmonella enterica*. *Infect Immun*. 77:3227-3233, 2009.
- SILVEIRA, W.D., FERREIRA, A., BROCCHI M., HOLLANDA L.M., CASTRO A.F.P., YAMADA A.T. & LANCELLOTTI M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol*. 85:47-53, 2002.
- SKYBERG, J.A, JOHNSON, T.J & NOLAN, L.K. Mutational and transcriptional analyses of an avian pathogenic *Escherichia coli* ColV plasmid. *BMC Microbiol*. 29: 8-24, 2008.
- SKYBERG, J.A., SIEK, K.E. DOETKOTT, C. & L.K. NOLAN. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J Applied Microbiol*. 102: 548–554, 2007.
- SKYBERG, J.A., T.J. JOHNSON, J.R. JOHNSON, C. CLABOTS, C.M. LOGUE & L.K. NOLAN . Acquisition of Avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect Immun*. 74:6287-6292, 2006.
- TORRES, A.G., ZHOU, X. & KAPER, J. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 73: 18-29, 2005.

- TWINE, S., M. BYSTRO, W. CHEN, M. FORSMAN, I. GOLOVLIOV, A. JOHANSSON, J. KELLY, H. LINDGREN, K. SVENSSON, C. ZINGMARK, W. CONLAN & A. SJÖSTEDT . A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-Kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect. Immun.* 73:8345–8352, 2005.
- TYLER, C.D., CHERYL, A.F.L., DIEKMAN, A.B.D. & FOLEY, S.L. Evaluation of Differentially Expressed Proteins Following Serum Exposure in Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Diseases* 52:23–27, 2008.
- WANG, S., NIU, C., SHI, Z., XIA, Y., YAQOUB, M., DAI, J. & LU, C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 79 (1) : 279-87, 2011
- WANG, Y. & K. S. KIM. Role of *OmpA* and *IbeB* in *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Pediatr. Res.* 51:559–563, 2002.
- WASHBURN, M.P., WOLTERS, D. & J.R.YATES III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* 19: 242-247, 2001.
- WILSON, M.; MCNAB, R. & HENDERSON, B. *Bacterial Disease Mechanisms*. Cambridge University Press, CAMBRIDGE, 2002.

**CURRICULUM VITÆ resumido  
REIS, R.**

**1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Roberta Souza dos Reis

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, RS, Brasil, 15/03/1982

**Endereço profissional:** Sarmento Leite, 500, Cidade Baixa, Porto Alegre/RS

**Telefone profissional:** 51-33084181 **E-mail:** [betasreis@gmail.com](mailto:betasreis@gmail.com)

**2. FORMAÇÃO:**

Curso técnico de Biotecnologia (Escola técnica da UFRS/ 2001-2002)

Graduação em Farmácia (UFRGS/ 2003-2007)

**3. ESTÁGIOS:**

(de 04/2002 - 09/2002) Estágio curricular para obtenção do título de técnico em biotecnologia no Hospital de Aeronáutica de Canoas – HACO

Estágio realizado no Laboratório de Análises Clínicas, exercendo atividade de técnica nos departamentos de microbiologia/urinálise, bioquímica, imunologia, hematologia e coleta de sangue.

(de 02/2004 – 04/2004) Estágio de iniciação científica no laboratório 103 do Depto de Biofísica, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Fabiana Horn. Título do projeto: Apoptose Induzida por Cepa Patogênica Aviária de *Escherichia coli*.

(de 2004 - 2005) Atividade de Extensão Universitária no laboratório 206 do Depto de Parasitologia da UFRGS, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Marilise Brittes Rott. Título do projeto: Prevalência de Enteroparasitas entre Crianças Carentes de Idade Escolar em um Loteamento em Porto Alegre.

(de 03/2007 – 07/2007) Estágio curricular para obtenção do título de farmacêutico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA

**4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR**

(05/2004 – Atual) Atuação como Técnica de Laboratório no Preparo de Aulas Práticas nos Setores de Parasitologia e Microbiologia do Depto de Microbiologia da UFRGS

**5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS**

1. Sílvia R. Pavan da Silva, Arrosi, Natacha, Jesus, Roberta Estefanello de, REIS, Roberta Souza dos, ROTT, Marilise  
ENTEROPARASIToses EM PORTADORES DE NECESSIDADES ESPECIAIS – PREVALÊNCIA EM INDIVÍDUOS ATENDIDOS EM INSTITUIÇÕES DO MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE-RS. Revista de Patologia Tropical (Impresso). , v.39, p.123 - 129, 2010.

2. REIS, Roberta Souza dos, HORN, Fabiana  
Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria



interactions in enteric diseases. Gut Pathogens. , v.2, p.8 - , 2010.

3. BENCKE, Amanda, ARTUSO, Georgia, REIS, Roberta Souza dos, BARBIERI, Nicolle, ROTT, Marilise Enteroparasitoses em Escolares Residentes na Periferia de Porto Alegre. Revista de Patologia Tropical (Impresso). , v.35, p.31 - 36, 2006.

## 6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. REIS, Roberta Souza dos, HORN, Fabiana

Análise proteômica da cepa MT78 de Escherichia coli patogênica aviária (APEC) isolada de fibroblastos aviários In: XX Congresso Latino Americano de Microbiologia, 2010, Montevideo, Uruguay.

2. REIS, Roberta Souza dos, HORN, Fabiana

Análise proteômica da cepa MT78 de Escherichia coli patogênica aviária (APEC) isolada de fibroblastos aviários In: XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Ipojuca-PE.

3. Arrozi, Natacha, Jesus, Roberta Estefanello de, REIS, Roberta Souza dos, Silva, Sílvia Regina Pavan da, ROTT, Marilise

Enteroparasitoses em Portadores de Necessidades Especiais em Duas Instituições de Porto Alegre-RS In: 26ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e 5ª Reunião da Rede Nacional de Pesquisa Clínica em Hospitais de Ensino e 13º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde do Mercosul, 2006, Porto Alegre-RS

4. BENCKE, Amanda, ARTUSO, Georgia, REIS, Roberta Souza dos, BARBIERI, Nicolle, ROTT, Marilise Investigação Parasitológica em Crianças Carentes de uma Escola de Porto Alegre, RS. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre-RS.

5. BENCKE, Amanda, ARTUSO, Georgia, REIS, Roberta Souza dos, BARBIERI, Nicolle, MENTZ, Márcia Levantamentos de Enteroparasitoses em Crianças Carentes de um Loteamento no Município de Porto Alegre, RS. In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e I Encontro de Medicina Tropical do Conesul, 2005, Florianópolis-SC.

6. BENCKE, Amanda, ARTUSO, Georgia, REIS, Roberta Souza dos, BARBIERI, Nicolle, ROTT, Marilise Presença de Helminthos em Crianças da Periferia de Porto Alegre-RS In: 25ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e 12º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde do Mercosul, 2005, Porto Alegre-RS.

7. MENTZ, Márcia, ARAÚJO, Cristina, ROTT, Marilise, REIS, Roberta Souza dos

Prevalência de Enteroparasitoses em Crianças Oriundas de 4 Acampamentos de Colonos Sem Terra-RS In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e I Encontro de Medicina Tropical do Conesul, 2005, Florianópolis, SC.

8. ROTT, Marilise, MENTZ, Márcia, REIS, Roberta Souza dos

Sobrevivência de Larvas Rabditóides de Strongyloides stercoralis sob Refrigeração e Formol 10% In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e I Encontro de Medicina Tropical do Conesul, 2005, Florianópolis, SC.

9. BENCKE, Amanda, ARTUSO, Georgia, REIS, Roberta Souza dos, BARBIERI, Nicolle, ROTT, Marilise Prevalência de Enteroparasitas entre Crianças Carentes de Idade Escolar em um Loteamento no Município de Porto Alegre In: 24ª Semana Científica do HCPA e 11º Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde do Mercosul, 2004, Porto Alegre-RS.

