

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) é um bastonete curto gram-negativo responsável por infecções extra-intestinais em frangos, que causam grandes prejuízos na avicultura pela sua mortalidade e condenação das carcaças. Entre as cepas APEC, a MT78, que foi isolada na França em 1982, é conhecida por ser bastante virulenta e invasiva, sendo capaz de se aderir a e invadir células não-fagocitárias (fibroblastos). Ela é também capaz de provocar apoptose em macrófagos aviários e causar infecção sistêmica quando inoculada pela traquéia de frangos de 5 semanas de idade.

A técnica de mutagênese marcada com assinatura (STM – signature-tagged mutagenesis) consiste na inserção aleatória de uma sequência de nucleotídeos no genoma bacteriano. Para isso, usa-se um plasmídeo contendo um transposon com uma pequena sequência de nucleotídeos (*tag*), flanqueada por outras sequências conhecidas para que a *tag* possa ser amplificada posteriormente. A inserção aleatória do transposon no genoma criará cepas mutantes, que podem ter sua virulência atenuada dependendo da região do genoma afetada pela alteração.

Esse trabalho propõe a execução da técnica de STM para a cepa APEC MT78, através da construção de mutantes aleatórios marcados com assinatura e da seleção daqueles que apresentarem atenuação de sua capacidade de invasão em células aviárias não-fagocitárias da linhagem CEC-32 *in vitro*. A infecção dessas células acontecerá em *pools* de mutantes, e após infecção elas serão lisadas e os mutantes serão recuperados e identificados através de hibridização DNA-DNA. Aqueles que não forem recuperados após a infecção devem possuir virulência atenuada, e serão estudados posteriormente. A técnica de STM aplicada nesse projeto permite seleção de mutantes para futuros ensaios *in vivo*, possibilitando a descoberta e/ou a confirmação de genes essenciais para a invasão de células aviárias pela cepa MT78 e sendo de grande utilidade para o melhor entendimento dos mecanismos de virulência utilizados por esse microrganismo.

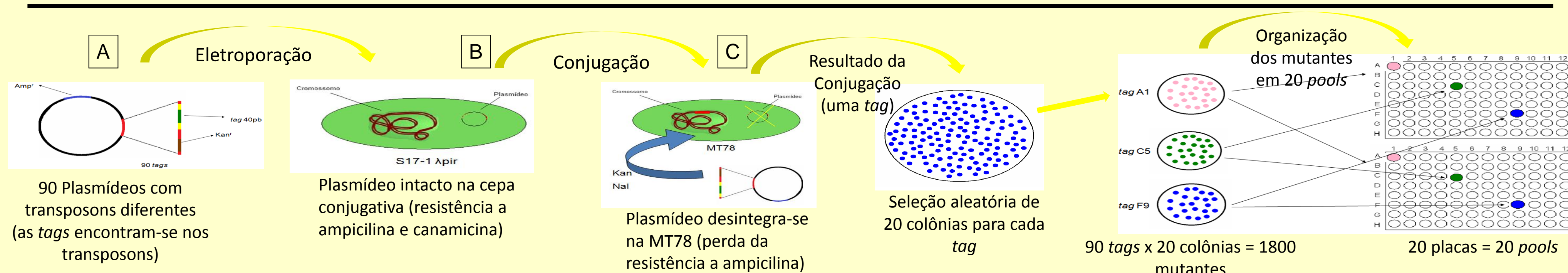


Fig. 1. Processo de construção da biblioteca de mutantes

OBJETIVOS

Geral:

Busca de novos genes fundamentais para a invasão de células não-fagocitárias.

Específicos:

- Construção de uma biblioteca de mutantes STM para a cepa APEC MT78;
- Determinação dos mutantes que tiveram sua capacidade de invadir atenuada.

- Conjugação: transmissão dos plasmídeos da cepa conjugativa para a cepa APEC MT78 selvagem, criando os mutantes (Fig. 1B). Cada conjugação gerou cerca de 100 colônias, das quais 20 foram selecionadas aleatoriamente para a criação de *pools* (20 mutantes x 90 *tags* = 1800 mutantes, divididos em 20 *pools* de 90 colônias) (Fig. 1C).
- Ensaios de invasão: para a seleção negativa dos mutantes, eles foram submetidos a ensaio de invasão *in vitro* em fibroblastos aviários (linhagem CEC-32). Após 1 h de infecção, os poços contendo as células foram lavados com PBS e incubados com gentamicina por 3 h. O material foi então lisado e as bactérias recuperadas (*output*) crescidas em meio diferencial. Uma amostra do inóculo (*input*) também foi crescida em meio diferencial (Fig. 2).

MÉTODOS E RESULTADOS

- Eletroporação: através da eletroporação, 90 plasmídeos contendo *tags* diferentes foram inseridos na cepa conjugativa *E. coli* S17- λ pir. Foi realizada a extração dos plasmídeos para confirmar a eletroporação (Fig. 1A).

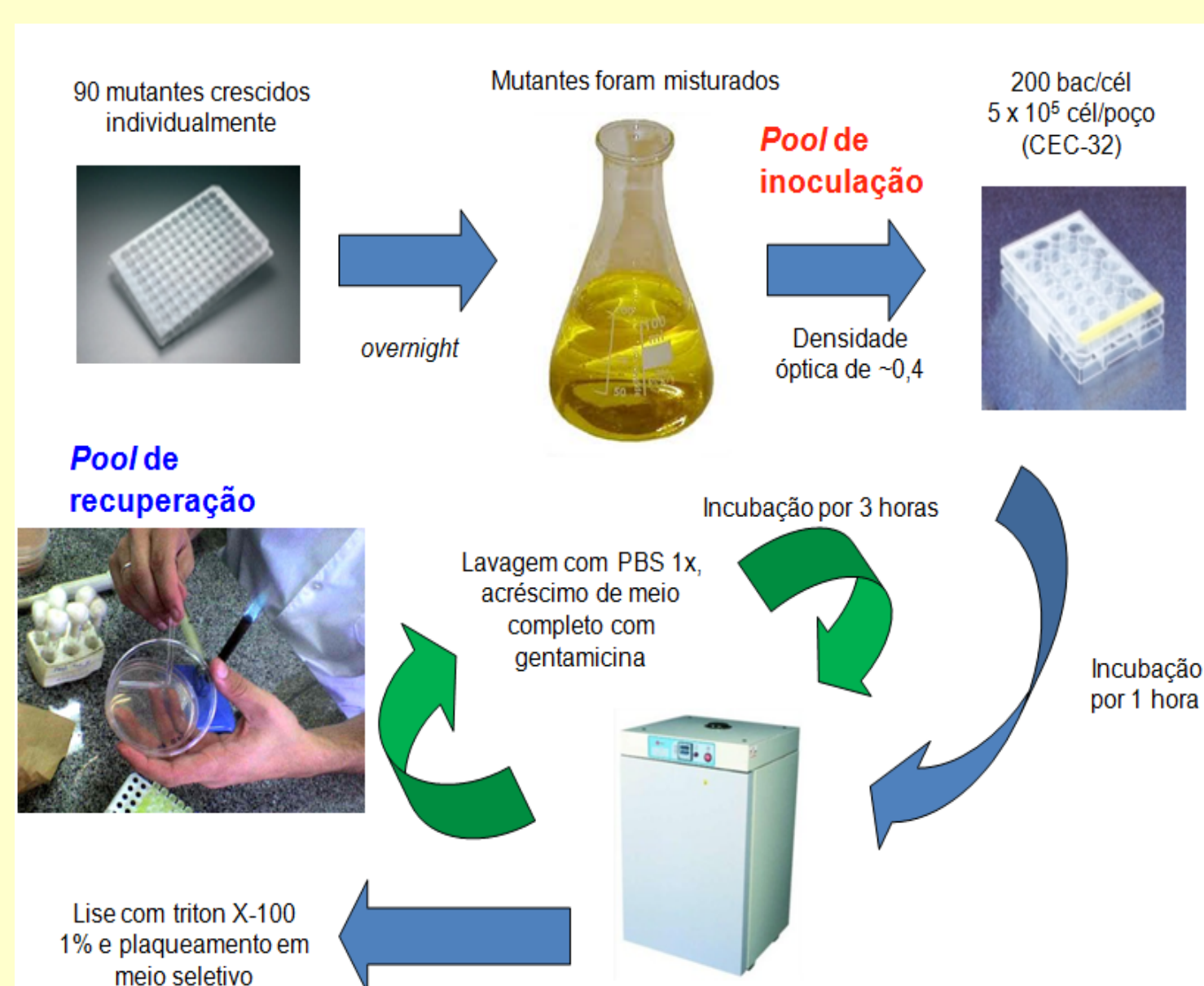


Fig. 2. Ensaio de invasão

PRÓXIMAS ETAPAS

- Extração do DNA dos mutantes dos *pools* de infecção e de recuperação;
- Identificação dos mutantes presentes no *pool* de infecção, mas ausentes no *pool* de recuperação, através de hibridização DNA-DNA utilizando a sequência das *tags* como molde;
- Identificação da região genômica interrompida pela *tag* através de sequenciamento e ferramentas de Bioinformática.