NATÁLIA GALDI QUEL

Escherichia coli Vacuolating Factor (ECVF) como fator associado a celulite aviária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

NATÁLIA GALDI QUEL

Escherichia coli Vacuolating Factor (ECVF) como fator associado a celulite aviária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Quel, Natália Galdi.
Escherichia coli Vacuolating Factor (ECVF) como fator associado a celulite aviária / Natália Galdi Quel. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fatores de virulência bacterianos.

Versão do título para o inglês: *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF) as a factor associated to avian cellulitis.

1. *Escherichia coli* 2. Bactérias patogênicas 3. Celulite 4. Frangos de corte 5. Citotoxinas 6. Apoptose I. Yano, Prof. Dr. Tomomasa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0199/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natália Galdi Quel.

Título da Dissertação: *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF) como fator associado a celulite aviária.

Orientador(a): Prof. Dr. Tomomasa Yano.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **94** nas fls. **106** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Antonio Fernando Pestana de Castro**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Vat (vacuolating autotransporting toxin) produzida por APEC: internalização, translocação intracelular e atividade citotóxica em células de origem aviária"* do qual participam o(s) aluno(s) **Natália Galdi Quel,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **29.08.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 30 de agosto de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA. 118/2013

D E C L A R A Ç Ã O

Declaro que o estudo intitulado *"Vat (vacuolating autotransporting toxin) produzida por APEC: internalização, translocação intracelular e atividade citotóxica em células de origem aviária lina"*, aprovado em 29.08.2011 pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP e do qual participa a aluna **Natália Galdi Quel** teve sua orientação transferida do Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro para o Prof. Dr. Tomomasa Yano.

São Paulo, 30 de outubro de 2013.

P/ Dumes

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA
ICB/USP

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2089-1**, sobre **"Estudo histológico das lesões de celulite induzidas pela Vat (vacuolating autotransporter toxin), produzida por *Escherichia coli* associada à celulite aviária"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Tomomasa Yano / Natália Galdi Quel**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **08 de fevereiro 2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2089-1**, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **February 8, 2010**.

Campinas, 08 de fevereiro 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Aos meus pais, que sempre foram minha
fonte de força e coragem.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, carinho e compreensão. Por sempre me ouvirem, me incentivarem e, principalmente, me apoiarem em todas as decisões importantes da minha vida. Vocês me fizeram acreditar em mim!

Ao meu irmão, que sempre esteve ao meu lado. Você sempre será o meu “nenê”!

À minha família, por todo apoio e incentivo, pela presença constante em minha vida apesar da distância.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela oportunidade que me deu e pela confiança que depositou em mim.

À minha amiga Annelize, por toda a ajuda, conselhos e amizade durante esses anos.

À minha amiga Stella, pela ajuda, por tantas placas de cultura que fez para mim. E também por todas as conversas, risadas e momentos de descontração.

Aos meus amigos do laboratório: Melina, Juliana, Krizzia, Mayara, Rogério, Robert, Luiz. E também aos agregados Ricardo, Ancelmo e Jéssica, igualmente queridos. Obrigada pela companhia, pelos momentos de alegria, risadas e também por sempre me ajudarem nos momentos de dificuldade. Vocês são mais que amigos de laboratório, vocês são meus amigos para a vida!

Aos meus filósofos preferidos: Raul, Fernando e Thiago. Obrigada pelos momentos de descontração, em que eu podia esquecer o estresse, e também pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, por aceitar me orientar no inicio do desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Paulo P. Joazeiro, pelo apoio e ajuda, indispensáveis para a realização deste trabalho. E também pelos conselhos e amizade.

À Dra. Lilian Rose Marques de Sá e ao Prof. Dr. Antônio Piantino Ferreira, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela ajuda técnica e pela paciência em me ensinar.

Às técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Unicamp, Adriane e Antônia, pela ajuda e atenção.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, por permitir a utilização de seu laboratório para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Facilidades para Pesquisa (CEFAP - ICB/USP) e ao Laboratório Nacional de Biociências/Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNBio - CNPEM), pelas análises em espectrômetro de massas.

À USP e à UNICAMP pelo acolhimento durante esses anos, e também a todos os funcionários que me ajudaram de alguma forma.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo apoio financeiro.

“A persistência é o menor caminho ao êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

QUEL, N. G. ***Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF) como fator associado a celulite aviária**. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Escherichia coli isoladas de lesões de celulite aviária em frangos de corte produzem uma citotoxina, denominada ECVF (*Escherichia coli* Vacuolating Factor), que causa intensa vacuolização citoplasmática em células de origem aviária, mas não em células de mamíferos. A importância de ECVF na patogenia da celulite foi avaliada por meio de ensaios de citotoxicidade em cultura de células e ensaios *in vivo*. ECVF purificado foi inoculado subcutaneamente em frangos de corte, e induziu alterações nos tecidos subcutâneo, adiposo e conjuntivo, com sinais de inflamação e presença de infiltrados de heterofilos, linfócitos e plasmócitos. Em ensaios de citotoxicidade, foi verificado que ECVF induz alterações no citoesqueleto e no núcleo de fibroblastos aviários, bem como apoptose, tempo-dependentes. Por microscopia eletrônica de transmissão, verificamos que ECVF induz alterações citoplasmáticas e nucleares que podem afetar diretamente o metabolismo celular, entre elas condensação da cromatina e fragmentação nuclear, intensa vacuolização citoplasmática, e desorganização do citoesqueleto e das organelas. Também foi verificada interação de ECVF com proteínas de células aviárias, em detrimento das de células de mamíferos, sugerindo uma especificidade da toxina a este tipo celular. Essas proteínas podem estar envolvidas na interação de ECVF com a célula, durante a indução de citotoxicidade que leva ao dano tecidual. Nossos resultados, apoiados por dados de estudos anteriores, permitem sugerir um importante papel de ECVF na patogenia da celulite aviária, podendo contribuir para elucidação do mecanismo de desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF). Celulite aviária.

ABSTRACT

QUEL, N. G. ***Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF) as a factor associated to avian cellulitis**. 2013. 88 f. Dissertation (Masters thesis in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Escherichia coli isolated from cellulitis lesions in broiler chickens produce a citotoxin, called ECVF (*Escherichia coli* Vacuolating Factor), which causes intense cytoplasm vacuolization in cells of avian origin, but not in mammalian cells. The importance of ECVF in the pathogenesis of avian cellulitis was assessed by citotoxicity assays in cell culture and in vivo assays. Purified ECVF was inoculated subcutaneously in broiler chickens, and induced alterations on subcutaneous, adipose and connective tissues, with signs of inflammation and infiltrates of heterophile, lymphocytes and plasma cells. In citotoxicity assays, we verified that ECVF induced alterations at cytoskeleton and nucleus of avian fibroblasts, such as apoptosis, time-dependent. In transmission electronic microscopy, we verified that ECVF induced citoplasmic and nuclear alterations, which can affect cellular metabolism directly, including chromatin condensation and nuclear fragmentation, intense cytoplasm vacuolization, and disorganization of cytoskeleton and organelles. It was also verified the interaction of ECVF with proteins of avian cells, instead of those from mammalian cells, suggesting the specificity of this toxin to this cells. These proteins may be involved in the interaction of ECVF with the cell, during the induction of citotoxicity, which will lead to the tissue damage. Our results, supported by data from previous studies, suggest an important role of ECVF in the pathogenesis of avian cellulitis, which may contribute to the elucidation of the mechanism of disease development.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF). Avian cellulitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1. Produção Brasileira de Carne de Frango.....24

Tabela 1. Exportação mundial de carne de frango 26

Gráfico 2. Principais causas de condenação (total e parcial) de carcaças de aves no Brasil, no ano de 2012.....27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de eletroforese SDS-PAGE.....48

Figura 2. Ensaio de citotoxicidade em cultura de células.....49

Figura 3. Ensaio de detecção de alterações no citoesqueleto.....51

Figura 4. Ensaio de apoptose (TUNEL) em células CEC-32 tratadas com ECVF.....53

Figura 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão de fibroblastos aviários (CEC-32) tratados com ECVF.....55

Figura 6. Análise histológica de fragmentos de pele e tecido subcutâneo de frangos de corte tratados com: PBS, *E. coli* K12, E. *coli* AC53 e ECVF em diferentes concentrações.....58

Figura 7. Detecção de proteínas de células aviárias possivelmente envolvidas na interação com ECVF.....60

Tabela 2. Proteínas possivelmente envolvidas na interação entre ECVF e células aviárias. Identificação por espectrometria de massas.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APEC - *Escherichia coli* patogênica aviária

CEC-32 – cultura de fibroblastos aviários

CEFAP - Centro de Facilidades para Pesquisa

CO_2 - dióxido de carbono

DAEC - *Escherichia coli* de adesão difusa

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

ECOR - coleção de referência de *Escherichia coli*

ECVF - *Escherichia coli* Vacuolating Factor

EHEC - *Escherichia coli* enteroemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC - *Extraintestinal Pathogenic E. coli*

FEG - fibroblastos de embrião de galinha

FPLC - Fast Protein Liquid Chromatography

HCl - ácido clorídrico

Huvec - células endoteliais da veia umbilical humana

IB - Instituto de Biologia

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

IL-10 - interleucina 10

LB - meio Luria-Bertani

LPS – lipopolissacarídeo

MAPA - Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEM - meio Mínimo Essencial de Eagle

NaCl - cloreto de sódio

$(NH_4)_2SO_4$ - sulfato de amônio

NMEC - *Escherichia coli* causadora de meningite neonatal

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PAI - ilha de patogenicidade

PBS - tampão salina-fosfato

pH - potencial hidrogeniônico

PIB - Produto Interno Bruto

SDS - sódio dodecil sulfato

SEPEC - *Escherichia coli* causadora de sepse

SFB - Soro Fetal Bovino

TBS-T - Tampão Tris-HCl suplementado com Tween 20 e BSA

TdT - enzima Terminal deoxynucleotidyl transferase

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

TUNEL - TdT-mediated dUTP nick end labeling

UBABEF - União Brasileira de Avicultura

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

USDA - Departamento de Agricultura dos EUA

USP - Universidade de São Paulo

Vat - *Vacuolating autotransporter toxin*

Vero - células de rim de macaco verde africano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....21

2 REVISÃO DE LITERATURA.....23

2.1 Produção e consumo de carne de frango no Brasil e no mundo.....24

2.2 Celulite aviária.....28

2.3 *Escherichia coli*.....31

2.4 Potencial zoonótico de *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC).....33

2.5 *Escherichia coli Vacuolating Factor* (ECVF).....35

3 OBJETIVOS.....37

3.1 Objetivo geral.....38

3.2 Objetivos específicos.....38

4 MATERIAL E MÉTODOS.....39

4.1 Amostra bacteriana.....40

4.2 Produção e Purificação de ECVF.....40

4.3 Culturas celulares e teste de citotoxicidade.....41

4.3.1 Culturas celulares.....41

4.3.2 Ensaio de citotoxicidade.....41

4.4 Detecção de alterações celulares *in vitro*.....42

4.4.1 Detecção de alterações no citoesqueleto.....42

4.4.2 Detecção de fragmentação de DNA (TUNEL).....42

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....43

4.5 Detecção de alterações teciduais *in vivo*.....43

4.5.1 Análise histopatológica.....43

4.5.1.1 Indução de lesões de celulite.....43

4.5.1.2 Análise microscópica.....44

4.6 Análise estatística.....44

4.7 Detecção de fatores proteicos de células aviárias potencialmente envolvidos na interação com ECVF.....44

4.7.1 Biotinilação de ECVF.....44

4.7.2 Preparo de proteínas celulares.....45

4.7.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).....45

4.7.4 Blotting.....46

4.7.5 Espectrometria de massas.....46

5 RESULTADOS.....47

5.1 Produção e Purificação de ECVF.....48

5.2 Culturas celulares e teste de citotoxicidade.....48

5.3 Detecção de alterações celulares *in vitro*.....50

5.3.1 Detecção de alterações no citoesqueleto.....50

5.3.2 Detecção de fragmentação de DNA (TUNEL).....52

5.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....54

5.4 Detecção de alterações teciduais *in vivo*.....56

5.4.1 Análise histopatológica.....56

5.4.1.1 Análise macroscópica.....56

5.4.1.2 Análise microscópica.....56

5.5 Detecção de fatores proteicos de células aviárias potencialmente envolvidos na interação com ECVF.....59

6 DISCUSSÃO.....62

7 CONCLUSÃO.....68

REFERÊNCIAS.....70

APÊNDICE – Artigo de Periódico.....81

1 INTRODUÇÃO

Celulite refere-se a um processo inflamatório do tecido subcutâneo, caracterizado pela presença de placas fibrino-caseosas (JEFFREY; CHIN; SINGER, 1999; NORTON; BILGILI; MCMURTREY, 1997). Foi descrita pela primeira vez em aves por Randall, Meakins e Watt (1984) na Inglaterra e consiste em uma das maiores causas de perda econômica na avicultura de muitos países (FALLAVENA, 2000). O problema só é detectado na inspeção durante o abate e ocorre mesmo nas aves provenientes de lotes com bom desempenho. A manifestação dessa afecção está relacionada a múltiplos fatores que incluem condições de produção, tais como: nutrição, manejo, saúde e ambiência (NORTON, 1997). *Escherichia coli* tem sido o microrganismo mais comumente associado à celulite (BRITO; VIDOTTO, 2003), entretanto, outros patógenos, como *Pasteurella multocida, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter agglomerans, Proteus vulgaris e Streptococcus dysgalactiae*, podem estar associados à manifestação dessas lesões (NORTON; HESS, 1999).

No Brasil, a celulite é uma causa crescente de condenação de carcaças de aves. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dos 5,09 bilhões de aves abatidas no Brasil em 2012, 2,67% foram condenados (total e parcialmente), sendo 6,91% desses devido à celulite. Seriam 9,4 milhões de carcaças afetadas pela celulite ao ano, configurando uma das mais importantes causas de condenação, ficando atrás somente da contaminação, responsável por 30% dos descartes, contusão e dermatose, responsáveis por 12,7% e 12,5%, respectivamente (BRASIL, 2013).

O papel da *E. coli* na celulite tem sido investigado em diversos trabalhos. Estudos demonstram que a infecção por *E. coli* leva a produção de lesões de celulite em frangos de corte (NORTON; BILGILI; MCMURTREY, 1997; PEIGHAMBARI et al., 1995b). Salvadori et al. (2001) descreveram que *E. coli* isoladas de lesões de celulite aviária produzem uma citotoxina que causa intensa vacuolização citoplasmática em células de origem aviária, mas não em células de mamíferos, e a denominaram ECVF (*Escherichia coli* Vacuolating Factor). Estudos anteriores sugerem que esta citotoxina está envolvida no desenvolvimento da celulite aviária (ARAGÃO, 2010; QUEL, 2010; SALVADORI, 2003), entretanto, estudos sobre a caracterização da atividade citotóxica da ECVF, bem como o estudo do efeito da toxina *in vivo*, se faziam necessários, a fim de confirmar ECVF como um importante fator associado à patogênese da celulite aviária.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção e consumo de carne de frango no Brasil e no mundo

De acordo com o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA, 2008), a produção mundial de carne de frango cresceu muito nos últimos trinta anos, passando de 7,47 milhões de toneladas em 1970 para 40 milhões de toneladas até o final do século 20.

A produção brasileira de carne de frango passou de 5,98 milhões de toneladas em 2000, para 13,05 em 2011, um aumento de quase 55% em apenas uma década. Esses números aproximam o Brasil da China, atualmente o segundo maior produtor mundial de carne de frango, cuja produção alcançou 13,2 milhões de toneladas em 2011 (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, UBABEF, 2012). Além disso, a avicultura brasileira é responsável por empregar mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e corresponde a aproximadamente 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (UBABEF, 2012).

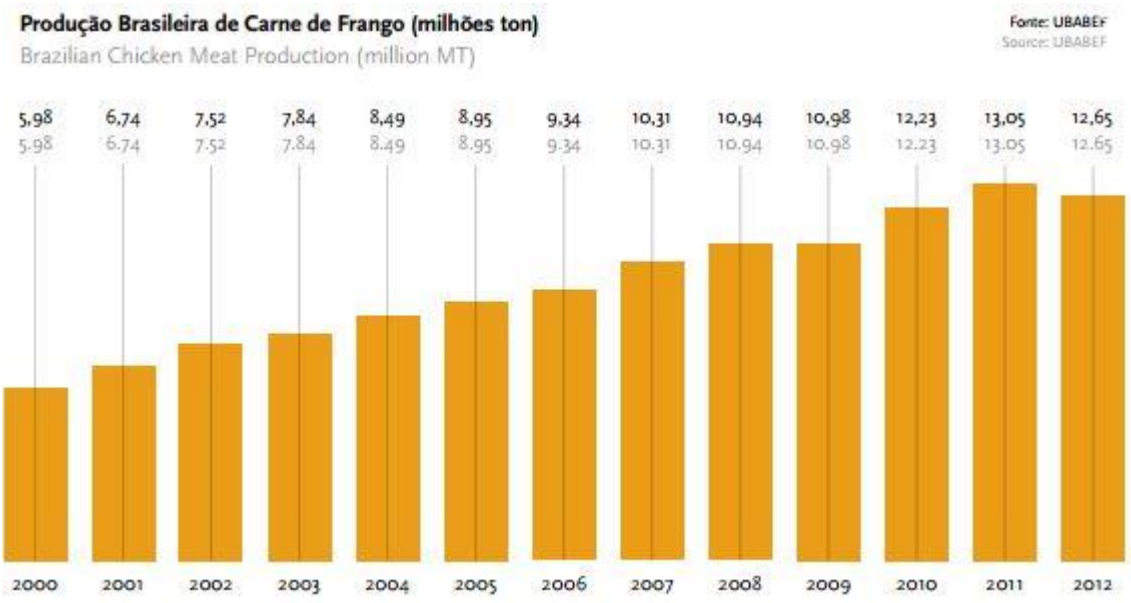


Gráfico 1. Produção Brasileira de Carne de Frango. Fonte: UBABEF - Relatório Anual 2013.[1]

[1] No ano de 2012, a avicultura brasileira sofreu uma crise que acarretou na diminuição da produção de carne de frango. Essa crise foi motivada pela estiagem no sul do país com a escassez de soja, que elevou o preço do grão em mais de 100%. Além disso, houve quebra da safra norte-americana de milho, o que elevou seu preço em mais de 40%. O aumento do preço dos grãos tem impacto direto na produção avícola, já que constituem a base da ração usada na alimentação dos animais (UBABEF, 2013).

O aumento na produção é um reflexo da mudança de hábito alimentar dos brasileiros que, até a década de 1990 se alimentavam majoritariamente de carne bovina. Isso se deve ao menor custo da carne de frango em relação à carne bovina, além de sua imagem de produto saudável e de qualidade (GIROTTO; AVILA, 2003). Segundo dados da União Brasileira de Avicultura, UBABEF (2001), em 1970 o consumo anual era de 2,4 quilos de carne de frango por habitante e, em 1985, este valor subiu para 9,4. Em 2000, o consumo por habitante era de 29,9 quilos e, após uma década, observa-se crescimento de 37% no consumo, que chegou a 47,3 quilos por habitante em 2011, um número considerado recorde (UBABEF, 2012).

Essa mudança de hábito é observada quando comparadas as produções das três principais carnes: bovina, suína e de frango. Em 2009, o Brasil produziu aproximadamente 22 milhões de toneladas destas três carnes, sendo que desse total, 11 milhões de toneladas (50,2%) foram representados pela carne de frango, 8 milhões (35,3%) pela carne bovina, e 3 milhões (14,4%) pela suína (Revista Produção Animal – Avicultura - AviSite, 2010).

Do total de frangos produzidos pelo país em 2011, cerca de 70% foi destinado ao consumo interno, e 30% a exportação, esta representando 3,9 milhões de toneladas. Com isso, o Brasil configura o maior exportador de carne de frango do mundo, seguido dos EUA, cuja exportação em 2011 foi de 2,9 milhões de toneladas, o que representa menos de 20% de sua produção total. A conquista do mercado internacional foi gradativa, sendo que em 1996 o Brasil exportava somente 571 milhões de toneladas, passando para 2,4 em 2004 e, finalmente, 3,9 em 2011. Segundo o MAPA (BRASIL, 2012), até 2020 o Brasil deverá concentrar 48,1% das exportações mundiais de carne de frango, se mantendo como principal exportador. Os estados que mais contribuem para esses números são os da região sul, representando os maiores produtores e exportadores do país, concentrando mais de 60% da produção e 70% da exportação total do país. O principal destino desta carne é o Oriente Médio, que importou 1,4 milhões de toneladas em 2011, seguido da Ásia (1,1 milhões) e África (498 mil toneladas) (UBABEF, 2012), sendo que a carne brasileira é comercializada em 142 países (BRASIL, 2012).

Tabela 1. Exportação mundial de carne de frango (1000 toneladas).

País / Ano	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Brasil	2.739	2.502	2.922	3.242	2.992	3.181
Estados Unidos	2.360	2.361	2.678	3.157	3.093	3.072
UE-27	696	689	635	742	783	992
Tailândia	240	261	296	383	379	432
China	332	322	358	285	291	379
Argentina	92	94	125	164	178	214
Canadá	102	110	139	152	147	147
Chile	60	64	39	63	87	79
Kuwait	97	38	60	70	70	70
Ucrânia	9	6	6	8	19	33
Emirados Árabes	20	10	30	30	30	30
Austrália	18	16	25	27	30	26
Jordânia	2	2	3	20	23	21
México	1	1	2	5	9	14
África do Sul	4	4	4	3	13	16
Coréia do Sul	2	3	6	9	11	16
Arábia Saudita	10	10	10	10	10	10
Singapura	12	46	15	9	7	9
Rússia	7	2	2	5	7	5
Filipinas	4	2	5	4	6	8
Outros	22	9	21	25	28	39

Fonte: Embrapa Suínos e Aves - Anuário estatístico -Avicultura.

Embora a produção seja bastante grande, a perda também é. Há inúmeros fatores que levam à condenação total ou parcial das carcaças, ambas resultando em perda econômica. Segundo o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carnes de Aves (BRASIL, 1998), “qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas”. No ano de 2012, foram abatidas 5,09 bilhões de aves no Brasil, sendo 96,85% desse total (4,93 bilhões) composto por frangos de corte. Destas, 136 milhões foram condenadas (total e parcialmente), sendo que 6,91% teve como causa a celulite. Portanto, foram 9,4 milhões de carcaças afetadas pela celulite, configurando uma das mais importantes causas de condenação, ficando atrás somente da contaminação, responsável por 30% dos descartes, contusão e dermatose, responsáveis por 12,7% e 12,5%, respectivamente (BRASIL, 2013). O gráfico 2 apresenta um comparativo (em porcentagem de condenação) entre as principais causas da condenação de carcaças de aves no Brasil, no ano de 2012, sendo as mais importantes:

contaminação, contusão, dermatose e celulite, nesta ordem (BRASIL, 2013). Além disso, alguns autores também apontam para a celulite aviária como uma importante causa de condenação (DERAKHSHANFAR; GHABARPOUR, 2002; FALLAVENA et al., 2000; GOMIS et al., 1997; KUMOR et al., 1998; MESSIER et al., 1993; NETO; MIRANDA, 2009; SANTANA et al., 2008; SCHERER FILHO, 2009; SILVA; MOTA, 2003).

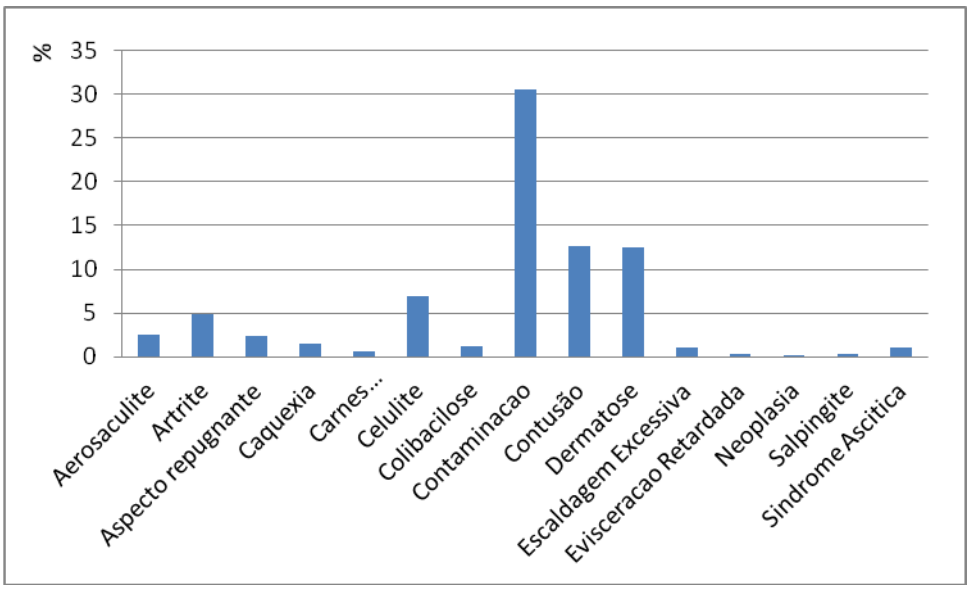


Gráfico 2. Principais causas de condenação (total e parcial) de carcaças de aves no Brasil, no ano de 2012. Dados apresentados em porcentagem de condenação. Fonte: MAPA, 2013.

2.2 Celulite aviária

Celulite se refere ao processo inflamatório do tecido subcutâneo, observado principalmente no peito e coxa das aves. Também é conhecida como processo infeccioso, processo inflamatório, “waffle skin” e dermatite necrótica (BRITO et al., 2002). Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez por Randall, Meakins e Watt (1984) na Inglaterra.

A doença só é detectada na inspeção, durante o abate, após serem retiradas as penas, e ocorre mesmo nas aves provenientes de lotes com bom desempenho. As aves afetadas não apresentam sinais clínicos, permanecendo aparentemente saudáveis e com crescimento normal, porém no momento do processamento da carne, nota-se a presença de placas caseosas sob a pele, além de um exsudato purulento, característicos da doença. A presença da lesão resulta na condenação parcial ou total da carcaça, que acarreta em uma elevada perda econômica para o setor avícola (ELFADIL et al., 1996; GLÜNDER, 1990; GOMIS et al., 2000; MESSIER et al., 1993; SINGER et al., 1999).

Norton (1997) sugeriu que a doença se origina a partir de um ferimento na pele da ave, causando perda da integridade e, assim, permitindo que as bactérias penetrem através da lesão e colonizem o tecido subcutâneo. Porém, Peighambari et al. (1995b) demonstraram, a partir da reprodução experimental da doença, que estes ferimentos na pele são necessários para o início da infecção, mas não são suficientes para desencadear a celulite, sugerindo que ações para reduzir essas lesões na pele podem significar a diminuição da celulite aviária. Sabe-se que também é necessário que uma grande quantidade de bactérias entre em contato com esta lesão para que ocorra o desenvolvimento da doença (FALLAVENA, 2000). Johnson et al. (2001b) sugerem que a maior prevalência de celulite é encontrada em machos, e justifica o fato devido a maior agressividade, o que ocasiona mais lesões em decorrência de brigas, já que quando os animais são inoculados experimentalmente com *E. coli* não há diferenças significativas entre machos e fêmeas.

Oderkirk (1997) sugeriu que a qualidade da cama das aves possa influenciar no desenvolvimento da doença, já que o material de que é feita pode favorecer o crescimento bacteriano, além de aumentar o risco de ferimentos na pele. A escolha da cama correta, associada a sua desinfecção em caso de reuso, muito comum

devido a redução de custos (MIGLIORANZA, 2011), pode diminuir as condenações parcial e total associadas à celulite. Além desse fator, a alta densidade populacional na granja também pode aumentar a chance de ocorrência das lesões, devido ao maior contato entre os animais (CAMPOS, 2000; FEDDES et al., 2003; PEIGHAMBARI et al., 1995a). O mau empenamento, também devido a densidade elevada, pode ser mais um fator contribuinte para a ocorrência de danos à pele, já que as penas conferem proteção contra lesões (GARCIA et al., 2002).

Alguns autores sugerem que a temperatura também é um fator importante para o desenvolvimento da celulite aviária. Schrader, Singer e Atwill (2004) verificaram que quando mantidos em temperaturas mais elevadas, os lotes tendem a apresentar mais celulite. Feddes et al. (2003) verificaram que, ao reduzir a temperatura, houve melhora da qualidade da carcaça, com 40% menos condenação, além de uma redução significativa na taxa de mortalidade dos frangos. Além disso, Schrader, Singer e Atwill (2004) também sugerem que dois importantes fatores para o desenvolvimento da doença são a quantidade de aves por cama e o tempo de vazio sanitário, sendo este último correspondente ao período em que o aviário fica fechado, após sua limpeza e desinfecção, até que se inicie um novo lote (FIGUEIREDO et al., 2007). Segundo este estudo, quando um menor número de aves é criado numa mesma cama e o tempo de vazio sanitário é aumentado, há uma diminuição significativa na ocorrência de celulite. Isso porque ao diminuir o número de aves por cama, o contato entre as mesmas é diminuído, dificultando a ocorrência de lesões, e quando o tempo de vazio sanitário é aumentado, a chance de o próximo lote entrar em contato com os micro-organismos é menor.

Escherichia coli tem sido o micro-organismo mais comumente isolado de lesões de celulite (GOMIS et al., 2000; MESSIER et al., 1993; OLKOWSKI et al.,1999; ONDERKA et al., 1997; SINGER et al.,2000), embora possa haver outros patógenos associados (NORTON; HESS, 1999). Segundo Olkowski et al. (2005), a suscetibilidade da pele dos frangos à colonização por *E. coli* pode estar associada a especificidades estruturais e físico-químicas. Além disso, Zavalla (2000) afirma que a fagocitose das bactérias no tecido subcutâneo de frangos é ineficiente, já que os fagócitos aviários não possuem o mesmo arsenal bioquímico presente nos fagócitos de mamíferos. Esses dados sugerem que as infecções tendem a ser mais crônicas nas aves.

A infecção por *E. coli* pode ser tratada com o uso de antimicrobianos, sendo os mais comuns: danfloxacina, gentamicina, enrofloxacina, apramicina, espectinomicina e ácido oxolínico (ANDREATTI FILHO, 2006). Porém, o uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento, e até mesmo prevenção, das doenças aviárias é um problema de saúde pública (JOHNSON et al., 2005; MOTA et al., 2005). Zanatta et al. (2004) encontraram 70% das cepas de *E. coli* aviária estudadas por eles resistentes a antimicrobianos, além de 77,5% multirresistentes, sendo que nenhuma droga foi eficiente contra todas as cepas estudadas. Bogaard et al. (2001) avaliaram a resistência das cepas de origem fecal de frangos e perus em comparação com as cepas, também de origem fecal, de galinhas caipiras, e verificaram um percentual significativamente maior de cepas resistentes no primeiro grupo, além de maior número de cepas multirresistentes. Johnson et al. (2007b) avaliaram a resistência de cepas de *E. coli* de origem fecal humana e aviária e verificaram que as cepas isoladas de fezes humanas podem ter sido oriundas de aves, por ingestão da carne contaminada, demonstrando então um importante problema de saúde pública e potencial zoonótico.

Visto os riscos do uso excessivo de antibióticos, é necessário o desenvolvimento de alternativas aos mesmos. Segundo Dobrindt e Hacker (2008), a inibição especifica de fatores de virulência é um método promissor para combater seletivamente as doenças bacterianas sem um crescente risco de desenvolvimento de cepas resistentes. O conhecimento detalhado da estrutura, função e regulação dos fatores de virulência bacterianos é essencial para o desenvolvimento de potenciais alternativas aos antibióticos. Desta forma, o presente trabalho pretende contribuir também para que, no futuro, a toxina ECVF possa ser alvo de drogas que visem prevenir a celulite aviária, minimizando assim a perda econômica associada à doença.

2.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. A maioria das linhagens são comensais, sendo membros da microbiota intestinal humana e de outros animais homeotérmicos e, portanto, não são patogênicas. Porém, há linhagens patogênicas, que podem causar doenças no trato intestinal ou em locais fora do intestino. As *E. coli* patogênicas intestinais podem ser classificadas em: EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica), EHEC (*Escherichia coli* enteroemorrágica), EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa), ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica), EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasora) e DAEC (*Escherichia coli* de adesão difusa) (KAPER et al., 2004; NATARO; KAPER, 1998). Já as *E. coli* extra-intestinais, ou ExPEC (*Extraintestinal Pathogenic E. coli)* (Russo; Johnson, 2000), são divididas em: UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica), SEPEC (*Escherichia coli* causadora de sepse), NMEC (*Escherichia coli* causadora de meningite neonatal) e APEC (*Escherichia coli* patogênica aviária), sendo esta última a única, dentre as supra-citadas, que constitui um patógeno animal (MOULIN-SCHOULEUR et al*.,* 2007). Entretanto, EPEC, EHEC e ETEC também podem causar doenças em animais, apesar de serem patógenos essencialmente de humanos. Para isso, se utilizam dos mesmos fatores de virulência produzidos pelas cepas humanas, além de fatores de colonização presentes somente nas cepas animais (KAPER et al., 2004).

Segundo Jhonson et al. (1998), para uma cepa de *E. coli* ser definida como APEC, é necessário que ela possua cinco marcadores genéticos plasmidiais, que são genes relacionados a virulência, sendo eles: *iutA* (sistema sideróforo - aerobactina), *hlyF* (potencial hemolisina aviária), *iss* (resistência ao soro), *iroN* (sistema sideróforo - salmoquelina) e *ompT* (protease de membrana).

Apesar das APECs serem classificadas como membros das ExPEC, a relação filogenética entre elas ainda não foi claramente definida (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007). Isso porque a classificação filogenética, descrita por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), é baseada na comparação da amostra desconhecida com uma coleção de referência de *E. coli* (ECOR), que consiste em 72 amostras de *E. coli* isoladas de diferentes hospedeiros e origens geográficas, porém nenhuma das amostras é de origem aviária, o que impede o posicionamento correto do grupo. Segundo Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), a classificação

permite agrupar as *E. coli* em quatro grupos: A, B1, B2 e D, sendo que as ExPEC geralmente se enquadram nos grupos B2 e D (BINGEN et al., 1998; BOYD; HARTL, 1998; JOHNSON; STELL, 2000; PICARD et al., 1999).

Como as outras *E. coli*, as APECs também são diferenciadas em sorogrupos e sorotipos, sendo essa classificação baseada no perfil de antígenos de superfície que a bactéria apresenta. O antígeno O (somático), constituído de lipopolissacarideo (LPS) determina sorogrupo, enquanto que a combinação do antígeno O com os antígeno H (flagelar) e K (capsular) define sorotipos (NATARO; KAPER, 1998). Pode ocorrer uma sobreposição de sorogrupos entre as ExPECs, ou seja, tanto ExPECs humanas como aviárias podem apresentar cepas de um mesmo sorogrupo, indicando similaridades entre as ExPECs (EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2007a; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

Algumas cepas aviárias e extra-intestinais humanas têm características em comum, incluindo sorogrupos, genes associados a fatores de virulência e grupos filogenéticos (CHÉRIFI et al., 1994; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008; MOKADY; GOPHNA; RON, 2005; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005). Entretanto, as relações filogenéticas entre cepas humanas e aviárias ainda não foram esclarecidas (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007), embora há muito tempo existam especulações sobre a origem alimentar (animal) das ExPECs (JOHNSON et al., 2007; LINTON et al., 1977; SHOOTER et al., 1970). Apesar das similaridades e da relação filogenética, a extensão do risco zoonótico associado a cepas de APEC ainda não é claro (ADIRI; GOPHNA; RON, 2003; EWERS et al., 2004; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

2.4 Potencial zoonótico de *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC)

Embora tenha sido amplamente aceito que a maioria das cepas de APEC não apresentam potencial zoonótico, estudos recentes demonstram que algumas cepas podem ser transmitidas a hospedeiros humanos, sugerindo que APEC pode causar infecções extra-intestinais nestes hospedeiros, além de possivelmente constituir um reservatório de genes de virulência que seriam transmitidos às ExPECs (ADIRI; GOPHNA; RON, 2003; EWERS et al., 2007; MOKADY; GOPHNA; RON, 2005; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005; RON, 2006).

Skyberg et al. (2006), ao transferir a uma *E. coli* comensal, por conjugação, um plasmideo que continha muitos genes associados a virulência de APEC, além de mostrar similaridade de conteúdo a um plasmideo e a uma ilha de patogenicidade (PAI) de UPEC, verificaram que ao adquirir esse plasmídeo, a *E. coli* tornava-se capaz de matar embriões de galinha, crescer na urina humana e colonizar rins de camundongos, demonstrando então que APEC pode configurar um patógeno de mamíferos.

Ewers et al. (2007), por meio de tipagem pelo método ECOR, verificaram que mais da metade das cepas de APEC analisadas por eles compartilhavam os mesmos antígenos O encontrados nas UPECs (O2, O6, O18 e O78), e quase 20% dos antígenos O de NMEC (O1, O2, O6, O18 e O45), portanto, muitos sorogrupos detectados em APEC estão notadamente envolvidos em doenças humanas, como infecções do trato urinário e meningite neonatal, sugerindo uma possível transferência de cepas aviárias para humanos, o que demonstra um potencial risco zoonótico das cepas aviárias (BONACORSI; BINGEN, 2005; JOHNSON; STELL, 2000; JOHNSON et al., 2001a; JOHNSON et al., 2003; LINTON et al., 1977; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

Johnson et al. (2007a) realizaram uma genotipagem de mil cepas de APEC e UPEC, quanto a genes envolvidos com virulência. Eles também sequenciaram uma cepa de APEC (APEC O1:K1:H7) e comparam com as sequências genéticas disponíveis de ExPECs humanas. Eles verificaram que o genoma da APEC O1 e de três cepas de UPEC eram bastante similares, com somente 4,5% do genoma da APEC não encontrado nos genomas das outras ExPECs. Além disso, algumas cepas de ExPEC humanas eram mais semelhantes a APEC O1 do que a outras

cepas de ExPEC humanas. Este trabalho suporta a teoria de que algumas cepas de ExPECs humanas e aviárias teriam uma origem comum, possivelmente alimentar.

Outros estudos também suportam a ideia de que APEC e ExPECs humanas apresentam semelhanças cromossômicas. Por exemplo, o gene *ibeA*, sabidamente envolvido na invasão de NMEC a células endoteliais microvasculares do cérebro, foi encontrado em uma frequência significativamente maior em cepas de APEC do que em cepas comensais aviárias. Além disso, ao inativar o gene *ibeA*, a cepa mutante perdia significativamente a capacidade de invadir células endoteliais microvasculares do cérebro *in vitro*, bem como de causar colibacilose em aves, comparado a cepa selvagem (com gene *ibeA*). Isto demonstra a importância deste gene para virulência de APEC e confirma a estreita relação existente entre APEC e ExPECs humanas (GERMON et al., 2005).

Há muitos exemplos de genes envolvidos com virulência presentes tanto em APEC como em ExPECs humanas (JOHNSON et al., 2007a), o que suporta a teoria de que APEC é capaz de causar doença extraintestinal em humanos, porém é necessária uma investigação maior quanto ao potencial zoonótico das APECs, visando esclarecer a possibilidade de transmissão de certas cepas de ExPEC entre animais e humanos, pois até o momento o que se tem é muito mais discussão do que prova concreta (JOHNSON et al., 2008).

2.5 *Escherichia coli Vacuolating Factor* (ECVF)

As APECs estão associadas com muitas doenças aviárias, a maioria extra-intestinal, como: salpingite, infecções do trato respiratório, colisepticemia, colibacilose, síndrome da cabeça inchada, celulite, entre outras (HORN et al., 2012; NAKAZATO et al., 2009). Isso se deve a presença de fatores de virulência, responsáveis pela patogenicidade da bactéria. Entre os principais, pode-se citar: adesinas e invasinas, envolvidas na colonização do sitio de infecção, sideróforos, importantes para sobrevivência da bactéria dentro do hospedeiro, cápsula polissacarídica, que confere proteção contra o sistema imune do hospedeiro, endotoxinas (LPS) e toxinas secretadas (JOHNSON E RUSSO, 2005; HORN et al., 2012; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

Salvadori et al. (2001) descreveram que *E. coli* isoladas de lesões de celulite aviária produzem uma citotoxina que induz intensa vacuolização citoplasmática em células de origem aviária, mas não em células de linhagens mamárias, e a denominaram ECVF (*E. coli* Vacuolating Factor). Esta intensa vacuolização nas células é um estado patológico, pois altera os processos de tráfego interno celular. O tamanho, bem como a quantidade dos vacúolos formados, perturbam a condição de homeostase, isto é, prejudicam a estabilidade fisiológica da célula (ARAGÃO, 2010).

Parreira e Gyles (2003) descreveram que em uma ilha de patogenicidade (PAI) de uma cepa de APEC era codificada uma proteína autotransportadora, a qual induzia formação de vacúolos intracelulares em células FEG (fibroblastos de embrião de galinha). Esta citotoxina foi denominada Vat (*Vacuolating autotransporter toxin*). Como a vacuolização induzida por Vat também é específica para células de origem aviária, assim como a de ECVF, e considerando outras similaridades, como atividade de protease, inicialmente pensou-se tratar da mesma proteína. Porém, a análise da banda de ECVF, obtida em gel SDS-PAGE, por espectrometria de massas[2] revelou não haver similaridade entre a sequência peptídica de ECVF e as proteínas depositadas nos bancos de dados do NCBI e no banco específico de *E. coli*. Esse dado leva a crer que ECVF e Vat são proteínas diferentes, apesar de terem funções biológicas similares.

---

[2] A análise da banda de ECVF obtida em gel SDS-PAGE foi realizada pelo LNBio-CNPEM (Laboratório Nacional de Biociências - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas/SP), em espectrômetro do tipo nanoESI-Q-TOF (Premier, Waters).

A citotoxina ECVF foi purificada em alto grau de pureza e, quando inoculada intravenosamente em frangos de corte, estimulou a liberação sistêmica de citocinas inflamatórias TNF-α e anti-inflamatórias IL-10 (QUEL et al., 2013; SALVADORI, 2003). O tempo de curso de liberação do TNF-α em frangos neste estudo foi similar ao requerido para o desenvolvimento das lesões de celulite em aves inoculadas com *E. coli*, na reprodução experimental do processo inflamatório da celulite (GOMIS et al., 1997; NORTON; BILGILI; MCMURTREY, 1997; PEIGHAMBARI et al., 1995b).

Aragão (2010) verificou que ECVF induz perda da viabilidade celular em células FEG (fibroblasto de embrião de galinha) atuando na integridade da membrana celular, na respiração mitocondrial e no citoesqueleto destas células. Além disso, Quel (2010) verificou que ECVF induz condensação da cromatina nuclear e acidificação citoplasmática.

Esses dados sugerem que a ECVF pode desempenhar um papel relevante no desenvolvimento da celulite, entretanto, estudos sobre a caracterização da atividade citotóxica da ECVF, bem como o estudo do efeito da toxina *in vivo*, utilizando frangos de corte, se faziam necessários, a fim de confirmar ECVF como um importante fator associado à patogênese da celulite aviária.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as alterações intracelulares induzidas por ECVF, bem como estudar histologicamente os efeitos da toxina no tecido subcutâneo de frangos de corte, a fim de confirmar ECVF como um importante fator da patogênese da celulite aviária.

3.2 Objetivos específicos

1. Estudar a ação de ECVF no citoesqueleto, núcleo e demais organelas de fibroblastos aviários;
2. Estudar, *in vivo*, a ação de ECVF nos tecidos subcutâneos de frangos de corte tratados com diferentes concentrações da toxina;
3. Estudar, *in vitro*, especificidade de ECVF para células aviárias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra bacteriana

Escherichia coli AC53, sorogrupo O21,83, originalmente isolada de lesões de celulite aviária, gentilmente cedida pelo Dr. C. L Gyles do Department of Pathology, University of Guelph, Ontário, Canadá foi utilizada para a produção e purificação da citotoxina ECVF (*Escherichia coli* Vacuolating Factor).

4.2 Produção e Purificação da ECVF

A toxina ECVF foi purificada de acordo com a metodologia descrita por Salvadori et al (2001) e adaptada por Aragão (2010), com modificações. Foi realizado cultivo da amostra de *E. coli* AC53 em LB, sob agitação de 100 rpm, durante 18 horas à 37 °C (Controlled Environment Incubator Shaker – New Brunswick Scientific CO., INC., Nova Jersei, EUA). Em seguida, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 20 minutos, a 4 °C (Centrífuga Beckhman, rotor JA14 - Beckhman Coulter, Brea, California, EUA). O sobrenadante da cultura obtido foi ultrafiltrado em coluna Hollow Fiber Cartridge, modelo UFP-100-C4X2MA, que possui poros de 100 kDa (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), e a fração menor que 100 kDa, foi submetido a nova etapa de ultrafiltração utilizando a membrana Amicon XM-50 (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). O material retido nesta segunda membrana foi cromatografado, primeiramente, em sistema de Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC, AKTA - GE Healthcare) em coluna cromatográfica de interação hidrofóbica HiTrap Phenyl Fast Flow (low sub) (GE Healthcare), com fluxo de 1,0 mL/min. O tampão de equilíbrio da coluna foi Tris-HCl 0,06 M pH 7,4. O material foi eluido em gradiente linear inverso de 1–0 M de $(NH_4)_2SO_4$ (Merck), e a eluição foi monitorada a 280 nm. Em seguida, foi feita a diálise do material obtido, em membrana Spectra/Por (Spectrum Labs, EUA). As frações com atividade citotóxica em cultura de células CEC-32 (fibroblastos aviários (item 3) foram submetidas à uma segunda etapa cromatográfica de exclusão molecular em coluna Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare), com fluxo de 0,5 mL/min e o tampão de eluição foi Tris-HCl 0,06 M pH 7,4 com 0,15 M de NaCl. A cada etapa do processo foram feitos testes em cultura de células, para verificar a presença de atividade citotóxica vacuolizante.

O grau de pureza da ECVF foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) sendo o gel posteriormente corado por impregnação de sais de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

4.3 Culturas celulares e teste de citotoxicidade

4.3.1 Culturas celulares

A atividade citotóxica foi verificada, em cada etapa do processo de purificação da ECVF, em fibroblastos aviários (CEC-32), adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro. Também foram utilizadas, para ensaio de detecção de fatores proteicos de células aviárias que interagem com ECVF e especificidade da toxina (seção 4.7), as células Vero (rim de macaco verde africano), Huvec (células endoteliais da veia umbilical humana) e FEG (fibroblastos de embrião de galinha). As células Vero e Huvec já eram mantidas na rotina laboratorial, enquanto que as células FEG foram gentilmente cedidas pela Fort Dodge Laboratories (Pfizer Animal Health, Campinas, São Paulo, Brasil).

As células foram mantidas em meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM), com exceção das células CEC-32, as quais requerem o meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). Os meios foram suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% da solução de antibióticos (Penicilina 1000 U/ml e Streptomicina 250 μg/ml).

A suspensão de células (2,5 x 10^5 células/mL) foi distribuída em placas de 96 ou 24 cavidades (Corning Costar - Whitehouse Station, Nova Jersei, EUA), adicionando 0,1 mL ou 1 mL, respectivamente, da suspensão celular por cavidade, de acordo com a necessidade de cada experimento. Em seguida, as placas foram incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas.

4.3.2 Ensaio de citotoxicidade

Após a formação da monocamada celular, o meio de cultura das placas foi dispensado e substituído por MEM ausente de soro fetal bovino e antibiótico. Uma

parte da amostra do material obtido dos processos de purificação por cromatografia foi aplicado às culturas celulares, em triplicata, para avaliar a preservação da atividade biológica da ECVF. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C em 5% de CO_2 pelo período de 24 horas, durante as quais foi realizada a leitura e visualização das alterações morfológicas esperadas (vacuolização), com auxílio do microscópio invertido (Nikon TE300, Shinagawa-ku, Tóquio, Japão).

4.4 Detecção de alterações celulares *in vitro*

4.4.1 Detecção de alterações no citoesqueleto

As células CEC-32, cultivadas em placas de 24 cavidades com lamínulas, foram tratadas com ECVF na concentração de 40 µg/mL (CD50 determinada para FEG por Aragão (2010)) em diferentes tempos, 2, 4, 6, 18 e 24 horas, em triplicatas. Para a coloração, foi utilizada a faloidina conjugada com rodamina (Phalloidin-TRITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na concentração final de 5 µg/mL, seguindo o protocolo do fabricante. O núcleo de CEC-32 foi marcado com a sonda fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Foi realizada a montagem das lâminas para microscopia, as quais foram mantidas no escuro até o momento da visualização em microscópio de fluorescência (LEICA DM 2500 - Wetzlar, Alemanha).

4.4.2 Detecção de fragmentação de DNA usando método de TUNEL

As células CEC-32, cultivadas em placas de 24 cavidades com lamínulas, foram incubadas a 37 ˚C com ECVF purificada 40 µg/mL por 2, 4, 6, 18 e 24 horas, em triplicatas. Após serem fixadas com paraformaldeído 1,5%, as células foram processadas para marcação por TUNEL usando kit de detecção da morte celular "*in situ*" (Roche Applied Science – Penzberg, Upper Bavaria, Alemanha), de acordo com a instrução do fabricante. As lâminas foram visualizadas imediatamente em microscópio de fluorescência (LEICA DM 2500). Foram fotografados cinco campos representativos de cada tratamento. Então, foi feita contagem do número de células totais e apoptóticas de cada tratamento, somando os campos. Com os valores obtidos, foi calculada a porcentagem de células apoptóticas em cada tratamento e

foi realizada uma análise estatística dos dados, por meio do software GraphPad Prism version 5 for Windows ($p<0.05$), a fim de verificar se as diferenças eram significantes.

4.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Células CEC-32 foram cultivadas em placas de permanox (Nalge Nunc Internacional, EUA) e tratadas com ECVF purificada (40 µg/mL) por 6 e 18 horas. As células foram fixadas em solução contendo Glutaraldeído 2,5% (Polaron, Watford, Inglaterra) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M de pH 7,2, durante 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente. Após lavagem com solução salina/sacarose, foi realizada a pós-fixação com Tetróxido de Ósmio 1%, também em tampão cacodilato, durante 1 hora a 4 ºC. As células foram, então, desidratadas em gradiente de etanol, embebidas em Resina Epon (Polysciences, Inc. - Warrington, Pensilvânia, EUA) e mantidas em estufa a 60 ºC durante 72 horas, para polimerização da resina.

Cortes ultra-finos, com aproximadamente 60 nm de espessura das monocamadas celulares, foram obtidos em ultramicrótomo (Ultracut UCT®, Leica) e contrastados por acetato de uranila (Reidel-de Haën) a 2%, durante 30 minutos e por citrato de chumbo a 0,5% durante 10 minutos. A observação foi realizada ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 (Leica), operando em tensão aceleradora de 60 kV e as imagens foram capturadas utilizando o Sistema Morada (Gatan, Inc. - Pleasanton, Califórnia, EUA).

4.5 Detecção de alterações teciduais *in vivo*

A detecção de alterações teciduais *in vivo* foi realizada com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP, sob protocolo n° 2089-1, aprovado em 08 de fevereiro de 2010. Este ensaio foi conduzido anteriormente à aprovação pela CEUA do ICB/USP e foi acrescentado à dissertação por ser pertinente à conclusão dos resultados.

4.5.1 Análise histopatológica

4.5.1.1 Indução das lesões de celulite

Foi realizada seguindo a metodologia descrita por Norton, Bilgili e McMurtrey (1997). Foram utilizados seis frangos machos de 40 dias de idade, gentilmente cedidos por Seara Alimentos S.A., nos quais foram inoculados: a cultura bacteriana (*E. coli* isolada de lesões de celulite aviaria - AC53) diluída em PBS (1:10) como controle positivo (3 x 10^8 bactérias/mL); PBS e *E. coli* K-12 (3 x 10^8 bactérias/mL), como controles negativos; e a toxina ECVF em diferentes concentrações (0,01 mg/mL e 1 mg/mL). O volume final de 1 mL foi inoculado nos frangos na região do esterno por via subcutânea.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração comercial e com livre acesso a água, por seis dias após a inoculação e observados diariamente. Foram sacrificados por asfixia com dióxido de carbono.

4.5.1.2 Análise microscópica

Foi realizada a partir de fragmentos de pele de aproximadamente 0,5 mm de espessura. Os fragmentos foram fixados em Paraformaldeido 4% em tampão fosfato, desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Foram, então, cortados em micrótomo LEICA RM 2145 e corados com Hematoxilina-eosina. A observação dos cortes histológicos foi feita em microscópio LEICA DM 2500, Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP.

4.6 Análise estatística

Para determinar as diferenças significantes entre os grupos tratados e o controle dos resultados obtidos nas seções 4.4.2 e 4.5, foi realizada análise estatística dos dados. Para isso, utilizamos one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, através do software GraphPad Prism version 5 for Windows ($p<0.05$).

4.7 Detecção de fatores proteicos de células aviárias potencialmente envolvidos na interação com ECVF

4.7.1 Biotinilação de ECVF

ECVF purificada foi re-suspendida em PBS contendo 10 mg/mL de biotina (EZ-link sulfo-NHS-LC-biotin) e incubada por 1 hora a 37 °C. Em seguida, o excesso de biotina foi removido em coluna desalting (ZebaTM Spin Desalting Column) e ECVF biotinilada foi utilizada para detecção de proteínas em ensaio de *blotting* conforme metodologia abaixo. Todo o processo de biotinilação de ECVF foi realizado conforme recomendações do fabricante (Thermo Pierce - Rockford, Ilinóis, EUA).

4.7.2 Preparo de proteínas celulares

Células FEG (fibroblastos de embrião de galinha), Vero (células de rim de macaco verde africano) e Huvec (células endoteliais da veia umbilical humana) foram obtidas de crescimentos confluentes em placas de 150x20 mm. Foram utilizadas as três linhagens celulares para verificar se realmente há especificidade de ECVF às células de origem aviária, já que a toxina não induz efeitos citopáticos em células de mamíferos. Primeiramente, as monocamadas celulares foram lavadas duas vezes com PBS estéril (pH 7,4) e re-suspensas por raspagem em mesmo tampão, sendo posteriormente submetidas a tratamento com ultrassom (amplitude 20% por 2 min) em banho de gelo. Em seguida, o *pellet* insolúvel foi removido por centrifugação (10000Xg por 15 min. a 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado conforme descrito abaixo. A dosagem de proteínas nos extratos foi realizada conforme descrito por Bradford (1976).

4.7.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada segundo a metodologia proposta por Laemmli (1970), com gel de concentração a 4% e gel de resolução a 13%. Os extratos proteicos (50 µg) das três linhagens celulares foram combinados com o tampão de amostra (v/v) (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% de glicerol; 5% de 2-mercaptoetanol; 0,02% de Azul de Bromofenol) e fervidos por 5 min. A corrida foi realizada com voltagem constante de 80 V por 30 min, passando para 100 V por 3 horas. Nesta etapa foram feitos 2 géis, sendo um corado por Coomassie blue brilhante (R 250) (BLUM; BEIER; GROSS, 1987) e outro utilizado para técnica de *blotting*, conforme descrito a seguir.

4.7.4 *Blotting*

O ensaio de *blotting* foi realizado conforme descrito por Renesto et al. (2006), com algumas modificações. As proteínas celulares obtidas em SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad - Hercules, California, EUA). As membranas foram posteriormente bloqueadas em solução TBS-T (Tampão Tris-HCl 0,02M pH 7,6 com 0,13M de NaCl, suplementado com 0,1% de *Tween* 20 e 5,0% de BSA) por 1 h a 4 °C. Em seguida, a membrana foi incubada em solução PBS-T contendo ECVF biotinilada, na proporção 1:200 v/v *overnight* a 4 °C. Após o período de incubação, as membranas de *blotting* foram lavadas três vezes com TBS-T e incubadas com streptavidina conjugada com peroxidase (1:1000, GE Healthcare). A detecção da ligação de ECVF às proteínas celulares foi revelada por quimioluminescência.

4.7.5 Espectrometria de massas

A banda protéica para a qual foi verificada interação com a ECVF foi analisada por espectrometria de massas, realizada pelo CEFAP (Centro de Facilidades para Pesquisa, do ICB-USP), no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific), a fim de identificar as proteínas que a compõem e, assim, determinar potenciais fatores proteicos de células aviárias, que possivelmente interagem com ECVF.

5 RESULTADOS

5.1 Purificação da ECVF

A toxina ECVF foi purificada de acordo com a metodologia descrita por Aragão (2010), com modificações. A toxina purificada foi submetida a um gel de eletroforese de poliacrilamida, na presença de SDS (SDS-PAGE), para verificação da eficiência do processo de purificação. Na figura 1, observa-se a banda proteica referente a ECVF, com aproximadamente 56 kDa.

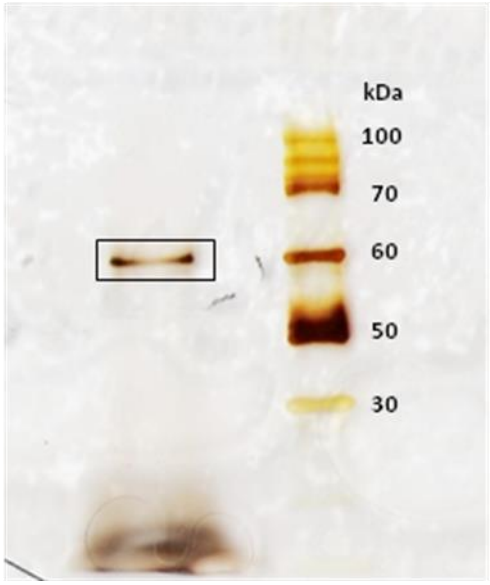


Figura 1. Gel de eletroforese mostrando a banda protéica,correspondente a aproximadamente 56 kDa.

5.2 Cultura celular

Foram realizados ensaios em células CEC-32 com a finalidade de verificar o efeito citotóxico da toxina ECVF, que consiste na formação de vacúolos no citoplasma das células de aves.

Após 6 horas da aplicação do sobrenadante da cultura bacteriana nas células, foi verificada a presença de uma grande quantidade de vacúolos no citoplasma destas. Estes vacúolos eram de forma arredondada e bastante numerosos, ocupando todo o citoplasma celular (figura 2B). Durante o processo de purificação da toxina, o efeito vacuolizante mostrou-se persistente nas células (figura 2C).

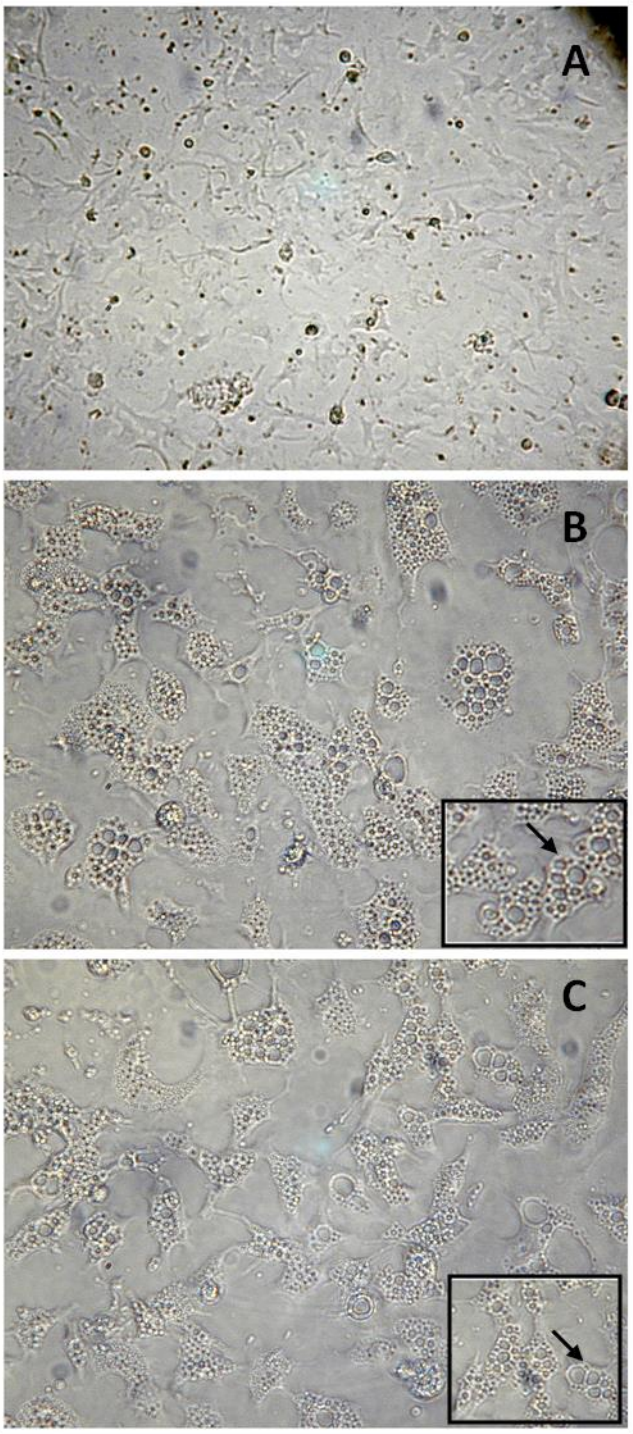


Figura 2. Cultura celular: microscópio óptico invertido. A: controle celular – 200x. B: células tratadas com sobrenadante de *E. coli* AC53 após 6h – 200x. C: células tratadas com toxina ECVF, obtida nos processos cromatográficos, após 6 horas de ensaio – 200x. Setas indicam vacúolos.

5.3 Detecção de alterações celulares *in vitro*

5.3.1 Detecção de alterações no citoesqueleto

As células CEC-32 foram tratadas com ECVF na concentração de 40 µg/mL (CD50) em diferentes tempos (2h, 4h, 6h, 18h e 24h). Após coloração com faloidina-rodamina, foi possível verificar os efeitos da toxina no citoesqueleto da célula. Após 2 horas de tratamento (figura 3B) já foi possível observar contração do citoesqueleto de actina, que foi verificada em todos os tratamentos, acentuando-se ao longo do tempo de exposição à toxina. A contração do citoesqueleto de actina altera a morfologia celular, causando retração das células e consequente perda de aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, ocasionando a destruição da monocamada, o que fica mais evidente após 6 horas de tratamento (figura 3D). Após 18 e 24 horas de exposição (figuras 3E e 3F, respectivamente), verifica-se morte celular, com evidente arredondamento das células decorrente da acentuada contração dos filamentos de actina, provocando intensa destruição da monocamada.

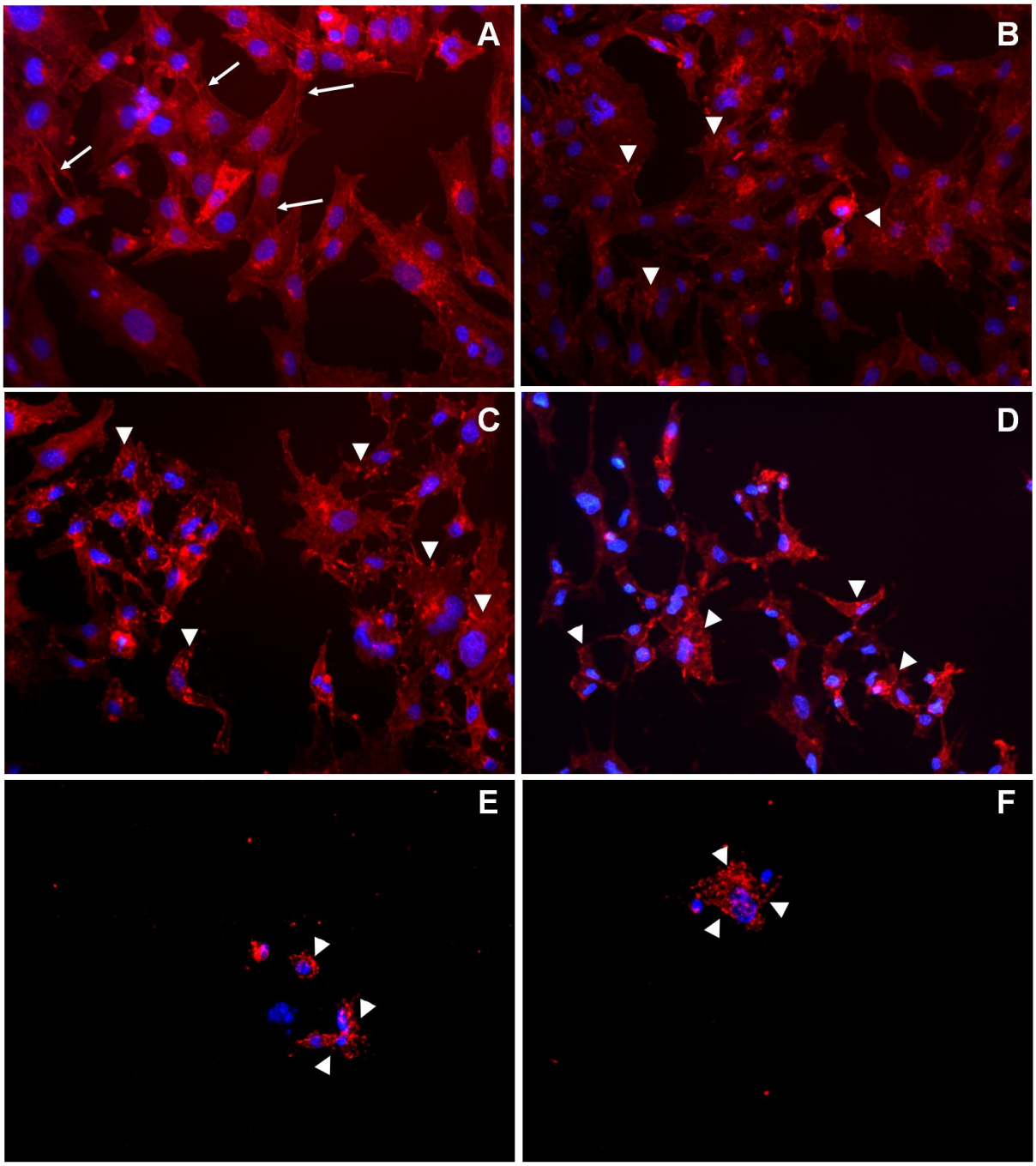


Figura 3. Células CEC-32 tratadas com ECVF, mostrando alterações no citoesqueleto – aumento de 400x. A: controle celular sem tratamento, B: após 2 horas tratamento com ECVF, C: após 4 horas tratamento com ECVF, D: após 6 horas tratamento com ECVF, E: após 18 horas tratamento com ECVF, F: após 24 horas tratamento com ECVF. Pontas de seta indicam filamentos de actina, cabeças de seta indicam contração dos filamentos de actina.

5.3.2 Detecção de fragmentação de DNA usando método de TUNEL

O ensaio de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling*) permite detectar e quantificar a apoptose em culturas celulares e tecidos. Durante a apoptose, ocorre fragmentação do DNA genômico. Os fragmentos podem ser identificados por marcação das extremidades 3´-OH livres com nucleotídeos modificados, em uma reação enzimática. A enzima *Terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) catalisa a polimerização dos nucleotideos marcados com fluoresceína à extremidade 3´-OH livre do fragmento de DNA. Como os nucleotídeos modificados são conjugados com fluoresceína, o DNA das células apoptóticas aparece marcado em verde, enquanto que o DNA das células viáveis aparece marcado em azul, devido à marcação pelo DAPI.

A contagem das células CEC-32 totais e apoptóticas de cada tratamento revelou que ao longo do tempo de exposição à toxina ECVF, o número de células totais diminuía, enquanto que a porcentagem de células apoptóticas em relação às células totais aumentava ($p<0,0001$) (figuras 4 G e H). Isso significa que ECVF induz apoptose em células aviárias, em um processo tempo-dependente. Além disso, após 18 e 24 horas, como demonstrado no ensaio anterior, ocorre contração do citoesqueleto de actina, com consequente retração celular e perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, causando destruição da monocamada. Devido a isso, o número de células totais nesses tratamentos é menor, pois a maior parte das células já havia perdido a aderência (figuras 4 E e F). Apesar disso, foi realizada a contagem das células remanescentes e então verificou-se que destas, a maior parte estava em processo de apoptose, sendo que após 18h de exposição, 72% das células estavam em apoptose e, após 24h, esse número subiu para 86%. As figuras 4 A a F mostram um campo representativo de cada tratamento.

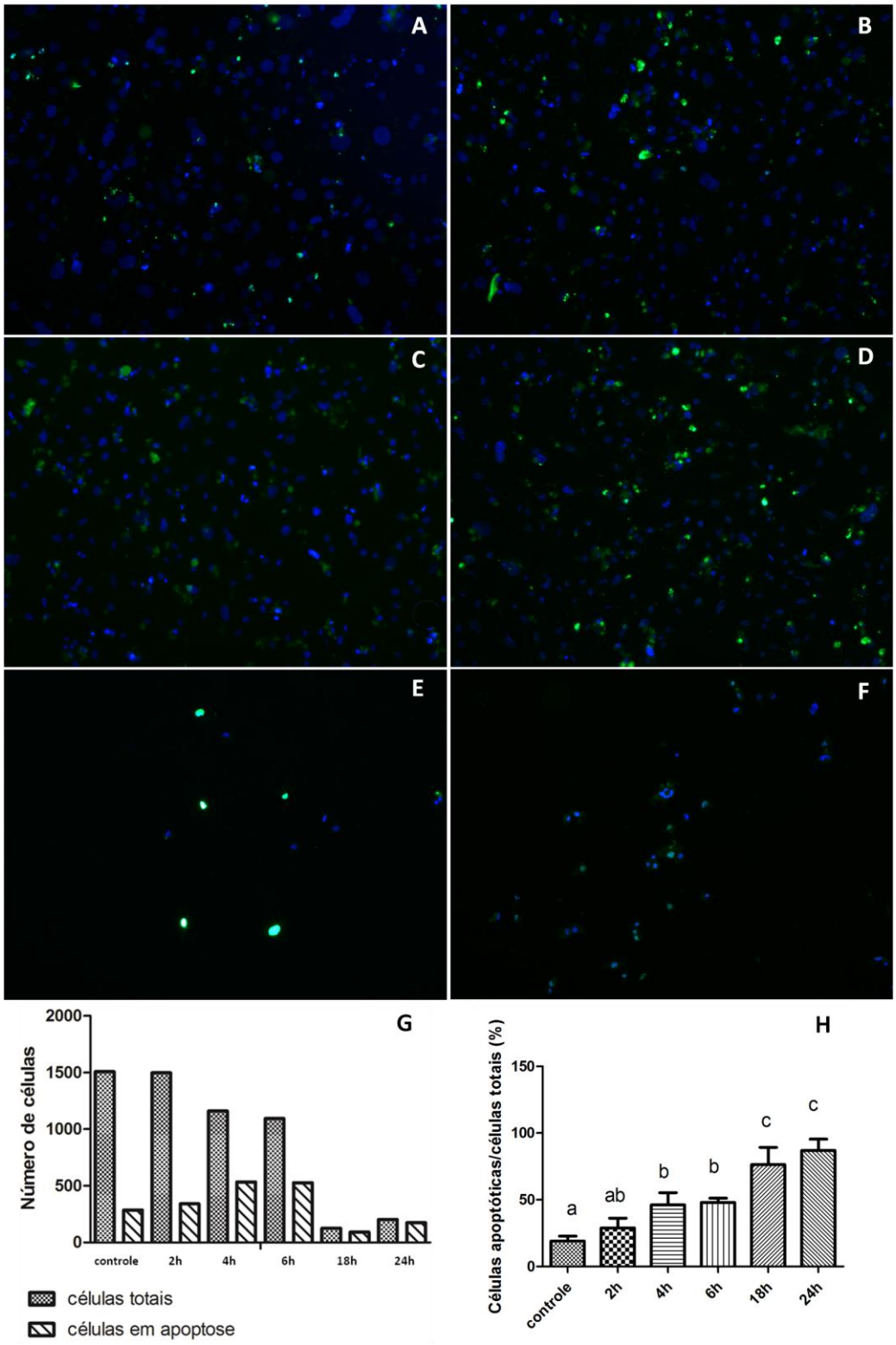


Figura 4. Ensaio de apoptose (TUNEL) em células CEC-32 tratadas com ECVF. A: controle celular, sem tratamento. B: células tratadas com ECVF por 2 horas. C: células tratadas com ECVF por 4 horas. D: células tratadas com ECVF por 6 horas. E: células tratadas com ECVF por 18 horas. F: células tratadas com ECVF por 24 horas. G: Comparação entre numero de células totais e apoptóticas em função do tempo de exposição à toxina ECVF. H: Porcentagem de células em apoptose em relação às células totais, em função do tempo de exposição à toxina ECVF. Dados são apresentados como média e desvio padrão de cinco campos de contagem de células totais e apoptóticas ($p<0,0001$). “a”, “b” e “c” indicam grupos estatisticamente diferentes (one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey).

5.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Foi realizada microscopia eletrônica de transmissão de células CEC-32 tratadas com ECVF por 6 e 18 horas. Foi verificado que a toxina ECVF induz alterações no núcleo e citoplasma das células, sugerindo comprometimento da estrutura e metabolismo celular, podendo levar os fibroblastos à morte. As figuras 5 A e B mostram um fibroblasto aviário normal, sem tratamento com ECVF, mostrando o núcleo intacto, com seus nucléolos bem organizados e cromatina frouxa. Já nas células tratadas com ECVF por 6 (figuras 5 C e D) e 18 horas (figuras 5 E e F), observa-se intensa vacuolização citoplasmática, com consequente desorganização das organelas, bem como do citoesqueleto já que a morfologia celular apresenta-se alterada. O núcleo também se apresenta bastante desorganizado, com condensação da cromatina e posicionamento da mesma junto à membrana nuclear, além de um início de fragmentação nuclear, que são sinais indicativos de apoptose. Além disso, após 18 horas de exposição à ECVF, é possível observar estruturas no interior dos vacúolos, as quais estavam ausentes em 6 horas de tratamento. Possivelmente, essas estruturas sejam componentes citoplasmáticos degradados.

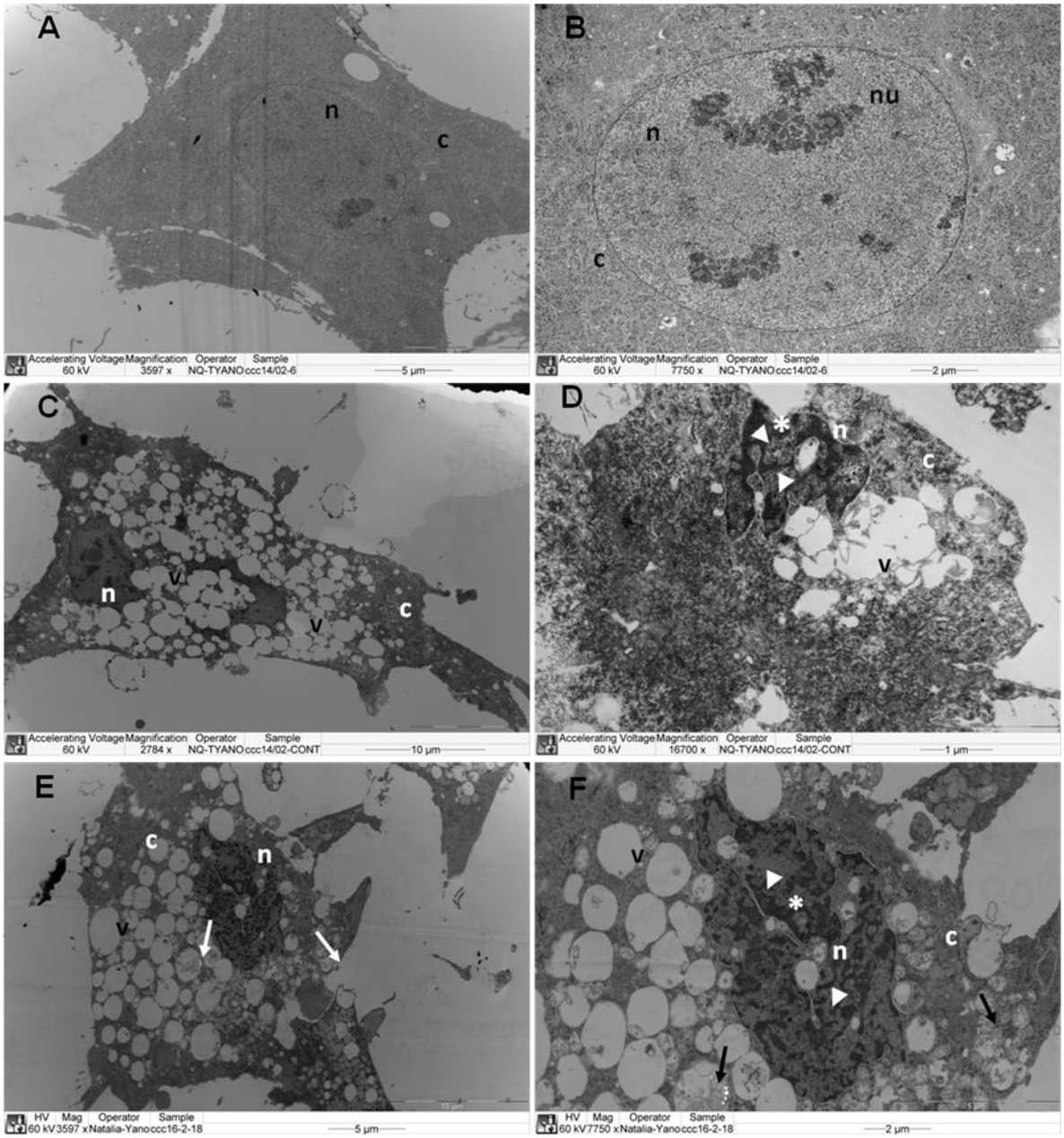


Figura 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão de fibroblastos aviários (CEC-32) tratados com ECVF. A: controle celular, sem tratamento; B: Núcleo de fibroblasto aviário, sem tratamento com ECVF; C: tratamento com ECVF por 6 horas; D: célula tratada com ECVF por 6 horas, mostrando núcleo bastante alterado; E: tratamento com ECVF por 18 horas; F: célula tratada com ECVF por 18 horas, mostrando fragmentação nuclear. Setas indicam estruturas intravacuolares; cabeças de setas indicam fragmentação nuclear; asteriscos indicam condensação da cromatina; “v” indica vacuolização citoplasmática; “n” indica núcleo; “c” indica citoplasma; “nu” indica nucléolos.

5.3 Detecção de alterações teciduais *in vivo*

5.3.3 Análise histopatológica

5.3.3.1 Análise macroscópica

Na análise macroscópica do tecido, foi verificado leve edema no local de inoculação de ECVF e edema moderado no controle negativo *E. coli* K-12. O controle positivo (*E. coli* AC53) mostrou lesões típicas de celulite, com edema, hemorragia e exsudatos fibrinocaseosos no local de inoculação. Não foi verificada lesão nos animais em que foi inoculado PBS.

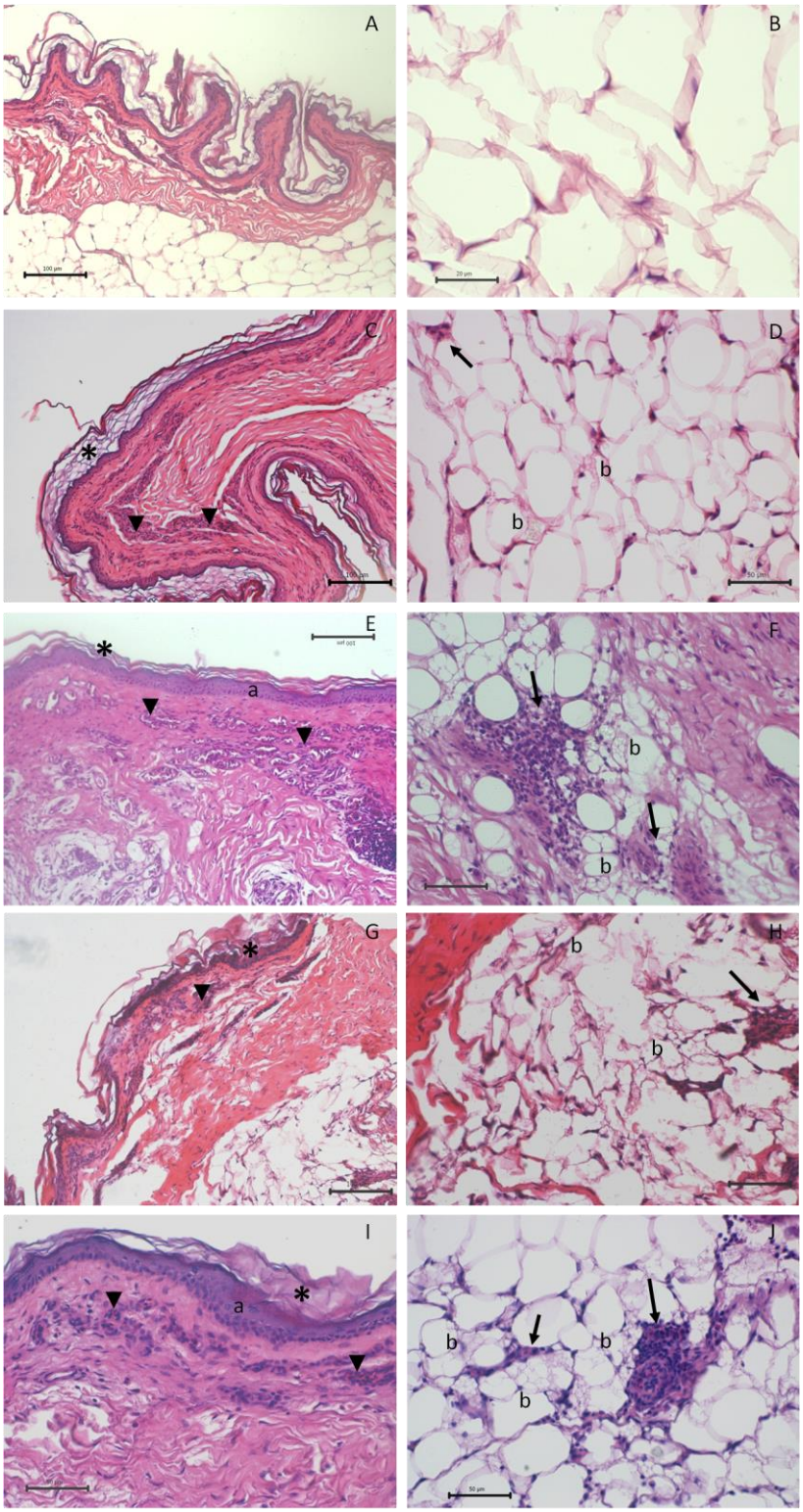
5.3.3.2 Análise microscópica

Comparado aos controles negativos, a análise microscópica revelou diferentes níveis de alterações epidérmicas e inflamação na derme e panículo dos animais tratados com ECVF ($p<0.0001$). No grupo tratado com 0,01mg de ECVF, foi observada uma hiperqueratose ortoqueratótica moderada na epiderme com perda das projeções típicas da pele de aves. Na derme, foi verificado edema e aumento no número de vasos superficiais, os quais estavam dilatados e congestos. Alguns capilares apresentaram leucostasia e um leve infiltrado inflamatório perivascular de heterófilos e células mononucleares foi detectado. No panículo, que consiste no tecido adiposo subcutâneo, foram observados também infiltrados de linfócitos, heterófilos e plasmócitos distribuídos perivascular e lobularmente (figuras 6 G e H). Esses resultados foram semelhantes aos observados para o grupo tratado com *E. coli* K12 (figuras 6 C e D). Apesar de não ser uma bactéria patogênica, *E. coli* K12 pode apresentar alguma imunogenicidade, provocando a resposta imune do hospedeiro, devido a presença de LPS, um constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativas que tem caráter de endotoxina.

No grupo tratado com 1mg de ECVF, foi observada leve hiperqueratose ortoqueratótica compacta na epiderme e moderada hiperplasia epidérmica com quarto a cinco camadas de células nucleadas, além de perda das projeções típicas da pele de aves. Também foi verificado moderado aumento dos capilares, que estavam dilatados e congestos. Presença de linfócitos, plasmócitos e heterófilos

localizados de perivascular a intersticialmente e associados com edema da derme também foi detectada. O infiltrado inflamatório provocou aumento no tamanho do panículo, além de multinucleação das células adiposas. Essas alterações são características de dermatite e paniculite (celulite aguda) (figuras 6 I e J).

O controle positivo (*E. coli* AC53) apresentou moderada acantose e hiperqueratose ortoqueratótica compacta na epiderme, além de perda das projeções típicas da pele de aves. Também foi observada moderada dilatação e congestão dos capilares e aumento dos feixes densos de colágeno na derme. Havia, ainda, edema na derme e moderado infiltrado inflamatório localizado de perivascular a intersticialmente, consistindo de linfócitos, plasmócitos e heterófilos (figuras 6 E e F). O panículo apresentou fibrina, necrose e infiltrado inflamatório perivascular associado a severo fibrinogranulomata, isto é, infiltrado de heterófilos rodeado de células gigantes multinucleadas e fibrose (celulite severa).


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
a
b

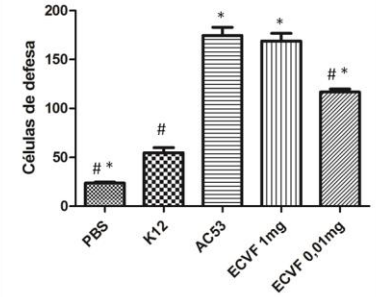

Células de defesa
200
150
100
50
0
*
#
*
*
*
PBS
K12
AC53
ECVF 1mg
ECVF 0,01mg

Figura 6. Análise histológica de fragmentos de pele e tecido subcutâneo de frangos de corte tratados: com PBS (controle negativo) – 200x (A) e 400x (B), *E. coli* K12 (controle negativo) – 200x (C) e 400x (D), *E. coli* AC53 (controle positivo) – 200x (E) e 400x (F), e com ECVF em diferentes concentrações, sendo 0,01mg – 200x (G) e 400x (H) e 1mg – 200x (I) e 400x (J). Asteriscos indicam hiperqueratose ortoqueratotica. Cabeças de seta indicam vasos dilatados e congestos, significando edema. Setas indicam linfócitos, heterofilos e plasmocitos infiltrados no panículo, distribuídos perivascular e lobularmente. “a” indica hiperplasia epidérmica com quatro a cinco camadas nucleadas. “b” indica células adiposas multinucleadas. K: Dados são apresentados como média e desvio padrão de seis campos de contagem de células de defesa. * indica diferenças estatisticamente significantes ($p<0,0001$) comparado ao tratamento com *E. coli* K12 (controle negativo), e # indica diferenças estatisticamente significantes ($p<0,0001$) comparado ao tratamento com *E. coli* AC53 (controle positivo).

5.4 Detecção de fatores proteicos de células aviárias potencialmente envolvidos na interação com ECVF

O ensaio de *blotting* evidenciou a interação de ECVF com uma banda proteica de FEG, o que indica que as proteínas que compõem essa banda possivelmente estejam envolvidas na interação de ECVF (figura 7) com a célula aviária, em um estágio anterior à sua ação ou internalização. A banda proteica para qual foi detectado o sinal de interação, correspondente a massas entre 100-140kDa, foi recortada do gel corado por Coomassie, digerida e analisada por Espectrometria de Massas (realizada pelo CEFAP-ICB/USP), gerando dois candidatos, sendo que essas proteínas identificadas estão descritas na tabela 2.

Este ensaio também sugere fortemente a especificidade de ECVF às células aviarias, visto que somente houve interação com as proteínas da FEG, não sendo detectado nenhum sinal para as proteínas de Vero (células de rim de macaco verde africano) e Huvec (células endoteliais da veia umbilical humana). Esses resultados foram compatíveis com dados anteriores de nosso grupo (SALVADORI et al., 2001) os quais mostraram que ECVF não induz efeitos citopáticos a outras linhagens celulares.

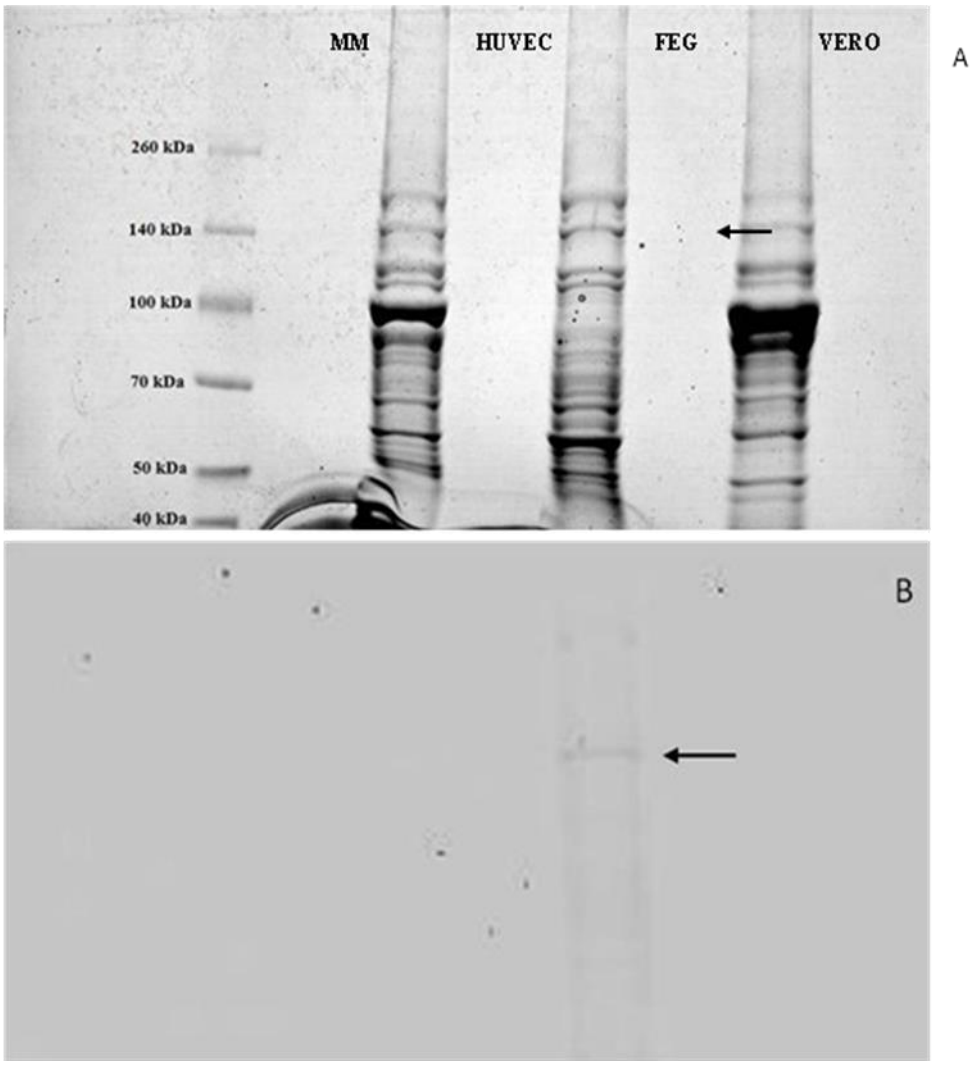


Figura 7. Detecção de proteínas de células aviárias possivelmente envolvidas na interação com ECVF. A: Gel de SDS-PAGE. B: *Blotting*, mostrando a banda proteica de FEG, para a qual foi detectada interação com ECVF.

Tabela 2. Proteínas possivelmente envolvidas na interação de ECVF com células aviárias. Identificação por espectrômetro de massas.

N° acesso do UniProt	**Descrição**	***Score***	**Cobertura**	**#Peptídeos únicos**	**# Peptídeos**	**# Aas**	**MM [kDa]**	**Função biológica**
Q90734	Alpha-actinin-4 OS=Gallus gallus GN=ACTN4 PE=1 SV=1 - [ACTN4_CHICK]	181,9	52,43	9	41	904	104,1	Proteína de ligação cruzada de F-actina. Ancora a actina a várias estruturas intracelulares. Provavelmente envolvida no tráfego de vesículas por meio de sua associação com o complexo CART. Envolvida na adesão entre células epiteliais.
P12003	Vinculin OS=Gallus gallus GN=VCL PE=1 SV=4 - [VINC_CHICK]	5,97	3,52	1	2	1135	124,5	Proteína ligante de F-actina, envolvida na adesão célula-matriz e célula-célula. Regula a expressão de E-caderina na superfície celular. Também é importante na morfologia celular e locomoção.

6 DISCUSSÃO

A vacuolização citoplasmática induzida por ECVF promove alterações citoplasmáticas e nucleares, entre elas a desorganização das organelas e do núcleo, fragmentação nuclear e alteração do citoesqueleto. Essas alterações podem afetar os processos de tráfego interno celular, alterando a condição de homeostase (ARAGÃO, 2010). Segundo Aufiero et al. (2006), injúrias que acarretam perda da integridade estrutural intracelular podem levar a célula à apoptose.

Apoptose foi o termo proposto por Kerr, Wyllie e Currie (1972) para designar a morte celular programada, isto é, quando a morte da célula não ocorre de maneira acidental. Este tipo de morte é uma maneira de preservar a homeostase celular. A apoptose pode ocorrer devido a alguns fatores, tanto fisiológicos como patológicos, por exemplo: na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos e na resposta inflamatória (RANGANATH; NAGASHREE, 2001). Este tipo de morte celular é caracterizado por alterações morfológicas coordenadas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Primeiro ocorre a retração da célula, que leva à perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas. A morfologia das organelas se mantém inalterada, com exceção das mitocôndrias que, em alguns casos, podem ter sua membrana externa rompida para que ocorra liberação de proteínas, dentre elas o citocromo c e a endonuclease G, importantes fatores apoptóticos, o que caracteriza o “ponto em que não há volta” da morte celular programada (BROKER et al., 2005). Ocorre condensação da cromatina, a qual se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A membrana celular forma prolongamentos, chamados *blebs*, e o núcleo se fragmenta, sendo que os fragmentos permanecem envoltos por membrana nuclear. Há aumento no número e tamanho dos *blebs*, os quais se rompem originando os corpos apoptóticos, que são porções celulares envoltas por membrana citoplasmática. Outra característica que define a apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, que apresenta um padrão característico: uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, sempre múltiplos de 200 pares de base (SARASTE; PULKKI, 2000). São esses fragmentos que são marcados pela enzima *Terminal deoxinucleotidil transferase* (TdT) no ensaio de TUNEL. A enzima acrescenta nucleotídeos marcados com

fluoresceína às extremidades 3´-OH livres dos fragmentos gerados durante a apoptose, assim, os fragmentos se apresentam corados em verde. Portanto, o ensaio de TUNEL é um indicativo de apoptose, embora sejam necessários outros ensaios que permitam elucidar a via apoptótica em detalhes. No presente estudo algumas alterações morfológicas que caracterizam a apotose foram observadas nas células de origem aviária (CEC-32) após o tratamento com o ECVF.

Por microscopia eletrônica de transmissão, foi possível verificar o início da fragmentação nuclear, a qual foi confirmada pelo ensaio de TUNEL, além de condensação da cromatina e concentração da mesma junto à membrana nucelar e em grumos cromatínicos. Também foi observada, por microscopia de fluorescência, intensa contração do citoesqueleto de actina, o que leva a retração das células e sugere a perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas.

Alguns autores (FARBER et al., 1999; PAROLIN; REASON, 2001) relatam a relação da apoptose com o dano tecidual, sugerindo que esse tipo de morte celular possa estar envolvida na patogênese de algumas doenças. Horn et al. (2012) sugeriu que a infecção dos pulmões de aves por *E. coli* patogênica aviária e por *E. coli* aviária não-patogênica de origem fecal (A_{fecal}), reproduzida experimentalmente, tem relação direta com apoptose de heterofilos e macrófagos. Esses autores inocularam em frangos de corte, por via intra-traqueal, três cepas de APEC e uma cepa de *E. coli* A_{fecal}. Após 12, 18 e 24 horas de infecção, os pulmões foram examinados quanto a presença de alterações histopatológicas, por meio de marcação dos cortes com hematoxilina-eosina e TUNEL, para detecção de células apoptóticas. A marcação com TUNEL revelou a presença de células apoptóticas após 12 horas de infecção, somente nas regiões inflamadas, e antes da observação de qualquer foco necrótico. As células marcadas com TUNEL eram bastante semelhantes a heterofilos, e os autores sugerem que algumas das células mortas também podem ser macrófagos, já que todas as cepas induziram ativação de caspases quando inoculadas em culturas de macrófagos aviários. Os autores concluem que as cepas induziram infecções locais nos pulmões das aves, acompanhada por inflamação e morte celular nas áreas afetadas. Portanto, há uma relação direta entre inflamação tecidual e apoptose.

Em concordância com Horn et al. (2012), verificamos que ECVF, além de induzir alterações intracelulares que levam a apoptose, também induziu danos teciduais condizentes com lesões de celulite. Possivelmente, a apoptose está

relacionada a esse dano *in vivo*, já que a trata-se de um mecanismo de manutenção da homeostase tecidual, em resposta a processos patológicos, como a inflamação induzida por ECVF.

Nosso grupo foi o primeiro a reproduzir lesões de celulite em frangos de corte usando a toxina ECVF purificada. Parreira e Gyles (2003) demonstraram que a cepa de *E. coli* septicêmica Ec222, que contém o gene *vat* pode causar celulite e doença respiratória septicêmica, em contraste ao mutante Ec222VPΔ2, do qual foi deletado esse gene. Além disso, eles também observaram que os sobrenadantes de Ec222 e de *E.coli* XL10/pVP16-85, que continham a ORF *vat*, induziam vacuolização intracelular em células FEG. Esses autores sugerem que Vat é importante para a patogenicidade de APEC. Como a vacuolização induzida por Vat também é específica para células de origem aviária, assim como a de ECVF, e considerando outras similaridades, como atividade de protease, inicialmente pensou-se tratar da mesma proteína. Porém, a toxina Vat predita teria 111,8 kDa, enquanto que ECVF tem 56 kDa. Esse fato, somado aos dados de espectrometria de massas que revelam não haver similaridade entre a sequência peptídica de ECVF e as proteínas depositadas nos bancos de dados do NCBI e no banco específico de *E. coli*, levam a crer que são proteínas diferentes, apesar de terem funções biológicas similares.

Estudos anteriores reproduziram experimentalmente lesões de celulite em frangos de corte usando *E. coli* (GOMIS et al., 1997; NORTON et al., 1997; PEIGHAMBARI et al., 1995b). Esses autores observaram a presença de infiltrados de células de defesa, como heterofilos, macrófagos e plasmócitos. Outros autores também observaram alterações microscópicas nos tecidos subcutâneo e adiposo, relacionadas à celulite, incluindo espessamento da derme (JEFFREY et al., 1999; NORTON et al., 1997), hiperqueratose moderada, hiperplasia da epiderme e neovascularização (MESSIER et al., 1993). Os presentes resultados, após inoculação dos frangos de corte com ECVF purificada, são semelhantes aos desses estudos, sugerindo que as alterações aqui observadas realmente estão associadas à celulite. Nós demonstramos que, dentre as substâncias testadas, somente ECVF foi capaz de induzir tais alterações ($p < 0.0001$). Essas alterações microscópicas também foram observadas em frangos (FALLAVENA et al., 2000; MESSIER et al., 1993) e perus (CARR et al., 1996) provenientes de granjas avícolas afetadas por celulite aviária. Fallavena et al. (2000) sugeriu que as lesões macroscópicas não são definitivas para a caracterização de lesões de celulite, porque não são específicas,

isto é, algumas doenças podem produzir lesões macroscópicas semelhantes, enquanto que as alterações microscópicas permitem caracterizar em definitivo a lesão. Assim, o fato de ECVF não ter induzido lesões macroscópicas significativas não é relevante, já que as alterações microscópicas estavam presentes.

Salvadori (2003) detectou um aumento na produção de TNF-α no soro de frangos de corte inoculados intravenosamente com ECVF, sugerindo que esta toxina pode induzir aumento sistêmico desta citocina pro-inflamatória. O tempo de liberação de TNF-α neste estudo foi similar ao requerido para o desenvolvimento de lesões de celulite em aves inoculadas com *E. coli*, em estudos anteriores de reprodução experimental de celulite (GOMIS et al., 1997; NORTON et al., 1997; PEIGHAMBARI et al., 1995b). Durante um processo inflamatório, no qual há liberação de citocinas pro-inflamatorias, também há aumento na produção de citocinas com ação anti-inflamatória, como IL-10 (MALEFYT et al., 1989). Essas citocinas apresentam propriedades imuno-modulatórias, isto é, apresentam a capacidade de regular a produção de TNF-α, e esse controle endógeno é de critica importância para determinar a magnitude da resposta inflamatória. Salvadori (2003) descreveu que IL-10 está envolvida na regulação de TNF- α em frangos inoculados intravenosamente com ECVF.

No presente trabalho, também foram identificadas proteínas de células aviárias possivelmente associadas à especificidade de ECVF à células de origem aviária. Foi verificada interação de ECVF somente com proteínas de células de ave, em detrimento das de células de mamíferos, sugerindo que essas proteínas podem estar envolvidas na interação inicial do ECVF com a célula, permitindo uma provável internalização ou desencadeando sinalização celular para a formação de vacúolos e morte. Essa hipótese é apoiada pelo fato da toxina não induzir citotoxicidade em células mamárias, somente em linhagens aviárias (SALVADORI et al., 2001). Para este ensaio foram utilizadas células FEG por esta ser uma linhagem primária, obtida diretamente do embrião de galinha. Segundo Freshney (2005), as culturas primárias mantêm as características do tecido original de maneira mais fidedigna, por não terem sofrido processo de transformação, ao qual as linhagens estabelecidas são submetidas para sua imortalização. A transformação pode ocorrer de maneira espontânea, química ou viral, sendo que todas acarretam em alterações morfológicas e instabilidade genética (FRESHNEY, 2005). Assim, o uso de uma

linhagem primária garante melhor reprodutibilidade em relação a quais proteínas são expressas pelas células no tecido do hospedeiro.

A especificidade entre toxinas e determinados hospedeiros é de extrema importância na compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenicidade bacteriana. Segundo Sewald et al. (2008), VacA (Proteína vacuolizante A de *Helicobacter pylori*) possui receptores específicos presentes em células de origem humana que permite a toxina se ligar na membrana citoplasmática, ser internalizada e translocada ao ambiente intracelular, promovendo vacuolização. Esses autores verificaram que o receptor utilizado por VacA para entrar nas células T humanas é integrina β2 e, quando a integrina β2 humana foi expressa em células T murinas, ocorreu a vacuolização das células, mediada por VacA. No entanto, quando as células murinas, sem o receptor humano, eram expostas a VacA nenhuma vacuolização era verificada. Isso demonstra a especificidade de VacA a células de uma determinada origem, assim como a especificidade observada para ECVF. Devido a ECVF apresentar uma atividade biológica semelhante à de VacA de *Helicobacter pylori*, considerando que ambas são citotoxinas vacuolizantes e multifuncionais, pode-se sugerir que provavelmente elas tenham um mecanismo de ação semelhante. Por microscopia eletrônica de transmissão, verificamos a presença de estruturas no interior dos vacúolos induzidos por ECVF em fibroblastos aviários. Estruturas semelhantes foram verificadas por Catrenich e Chestnut (1992) em vacúolos induzidos por VacA em células HeLa. Esses autores sugerem que essas estruturas sejam componentes citoplasmáticos degradados, pois eles verificaram acidez do pH intravacuolar, sugerindo que estes vacúolos sejam na verdade autofagossomos. Essa hipótese é apoiada pelo ensaio de contribuição da fase fluida da endocitose para formação dos vacúolos, o qual revelou que os vacúolos se comunicam, em algum ponto de seu desenvolvimento, com compartimentos derivados de endocitose. Assim, provavelmente os vacúolos são autofagossomos que degradam os componentem citoplasmáticos celulares, levando a célula à morte. Estudos futuros permitirão verificar se os vacúolos induzidos por ECVF têm a mesma natureza.

7 CONCLUSÃO

1. ECVF induz alterações citoplasmáticas e nucleares em fibroblastos aviários, incluindo desorganização das organelas e do núcleo, fragmentação nuclear, condensação da cromatina, intensa vacuolização citoplasmática e contração do citoesqueleto de actina;
2. ECVF induz apoptose em fibroblastos aviários;
3. ECVF induz lesões de celulite, a nível microscópico, nos tecidos subcutâneo, adiposo e conjuntivo de frangos de corte inoculados com a toxina purificada;
4. ECVF apresenta especificidade a células aviárias, sendo identificadas proteínas que possivelmente interagem com ECVF durante a indução de citotoxicidade que leva ao dano tecidual;

Em síntese, nossos resultados demonstram a participação de ECVF no desenvolvimento da celulite aviária. Estudos futuros permitirão elucidar o papel desta citotoxina na patogenia da doença e, assim, talvez ECVF possa ser alvo de novas drogas que previnam a celulite em frangos de corte.

REFERÊNCIAS*

REFERÊNCIAS*

ADIRI, R. S.; GOPHNA, U.; RON, E. Z. Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, p. 199-203, 2003.

ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2006. 314 p.

ARAGÃO, A. Z. B. **Vat (vacuolating autotransporter toxin) produzida por APEC (Avian Pathogenic *Escherichia coli*): efeitos intracelulares e distribuição filogenética**. 2010. 56f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

AUFIERO, B. M.; TSOKOS, G. C.; TSOKOS, M.; WONG, H. K. Apoptosis in tissue injury. In: TSOKOS, M. (Ed.). **Forensic pathology reviews**. Hamburg: Humana Press, 2006. v. 4, p. 331-351.

BINGEN, E.; PICARD, B.; BRAHIMI, N.; MATHY, S.; DESJARDINS, P.; ELION, J.; DENAMUR, E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 642–650, 1998.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. v. 8, p. 93-99, 1987.

BOGAARD, A. E. V. D.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; STOBBERINGH, E. E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers e poultry slaughters. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 763-771, 2001.

BONACORSI, S.; BINGEN, E., Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. **Int. J. Med. Microbiol**., v. 295, p. 373–381, 2005.

BOYD, E. F.; HARTL, D. L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **J. Bacteriol**., v. 180, p. 1159–1165, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**., v. 72, p. 248-254, 1976.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n.º 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico - sanitária de carne de aves. Brasília: 1998. Publicado no Diário Oficial da União de 26/11/1998, Seção 1, p. 226. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em: 27 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves/>. Acesso em: 27 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. Disponível em:<http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons/!sigsif.ap_condenacao_especie_rep_cons>. Acesso em: 10 out. 2013.

BRITO, B. G.; TAMEHIRO, C. Y.; OKANO, W.; LUZARDO,M. M.; BERBEL,M. M.; GUIMARÃES,I. G.. Celulite cervical em frangos de corte causada por *Eschericha coli*. **Revista Semina**. v. 23, p. 81-84, 2002.

BRITO, B. G.; VIDOTTO M. C. Clonal relationships among strains and virulence factors of avian *Eschericha coli* from cellulitis aviária. **Infection Immunity**, v. 71, p. 4175-4177, 2003.

BROKER, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin Cancer Res**., v. 11, p. 3155-162, 2005.

CAMPOS, E. J. Poultry Behavior. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 2, p. 93-113, 2000.

CARR, D.; SHAW, D.; HALVORSON, D. A.; RINGS, B.; ROEPKE, D. Excessive Mortality in Market-Age Turkeys Associated with Cellulitis. **Avian Diseases**, v. 40, p. 736-741, 1996.

CATRENICH, C. E.; CHESTNUT, M. H. Character and origin of vacuoles induced in mammalian cells by the cytotoxin of *Helicobacter pyori*. **J. Med. Microbiol.**,v. 37, p. 389-395, 1992.

CHÉRIFI, A.; CONTREPOIS, M. ; PICARD, B.; GOULLET, P.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O78 isolates from human and animal infections. **J. Clin. Microbiol**., v. 32, p. 1197-1202, 1994.

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

DERAKHSHANFAR, A.; GHANBARPOUR, R. A study on avian cellulitis in broiler chickens. **Veterinary Archive**, v. 72, p. 277-284, 2002.

DOBRINDT, U; HACKER, J. Targeting virulence traits: potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 409-413, 2008.

ELFADIL, A. A.; VAILLANCOURT, J. P.; MEEK, A. H.; JULIAN, R. J.; GYLES, C. L. Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. **Avian Diseases**, v. 40, p. 690-698, 1996.

EWERS, C.; JANBEN, T.; KIEBLING, S.; PHILIPP, H-C.; WIELER, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry.**Veterinary Microbiology**, v. 104, p. 91-101, 2004.

Ewers, C.; Li, G.; Wilking, H.; Kiessling, S.; Alt, K.; Antao, E. M.; Laturnus, C.; Diehl, I.; Glodde, S.; Homeier, T.; Bohnke, U.; Steinruck, H.; Philipp, H. C.; Wieler, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: how closely related are they? **Int. J. Med.Microbiol**., v. 297, p.163-176, 2007.

FALLAVENA, L. C. B. Enfermidades da pele e das penas. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. (Ed.). **Doenças das aves**. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000. v. 4, p. 37-45.

FALLAVENA, L. C. B.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; SILVA, A. B.; VARGAS, R. S.; NASCIMENTO, V. P.; CANAL, C. W. Diagnosis of skinlesions in condemned or downgraded broiler carcasses – a microscopicand macroscopic study. **Avian Pathology**, v. 29, p. 557-562, 2000.

FARBER, A.; CONNORS, J. P.; FRIEDLANDER, R. M.; WAGNER, R. J.; POWELL, R. J.; CRONENWETT, J. L. A specific inhibitor of apoptosis decreases tissue injury after intestinal ischemia-reperfusion in mice. **J. Vasc. Surg.**, v. 4, p. 752-760, 1999.

FEDDES, J. J. R.; Emmanuel, E. J.; Zuidhofe, M. J.; Korver, D. R. Ventilation rate, air circulation and BIRD disturance: Effects on the incidence of cellulitis and broiler performance. **Journal Applied Poultry Research**, v.12, p. 328-334, 2003.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SCHMIDT, G. S.; AVILA, V. S.; JAENISCH, F. R. F.; PAIVA, D. P. 2007. Recomendações técnicas para a produção, abate, processamento e comercialização de frangos de corte coloniais. Embrapa Suínos e Aves, Sistemas de Produção, 3. ISSN 1678-8850. Versão eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/SistemaProducaoFrangosCorteColoniais/glossario.htm#v>. Acesso em: 16 out. 2013.

FRESHNEY, R. I. Biology of cultured cells. In: FRESHNEY, R. I. (Ed.). **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 5. ed. Hoboken: Wiley-Liss, 2005. v. 1, p. 31-42.

GARCIA, R. G.; MENDES, A. A.; GARCIA, E. A.; NAAS, I. A.; MOREIRA, J.; ALMEIDA, I. C. L.; TAKITA, T. S. Efeito da densidade de criação e do sexo sobre o

empenamento, incidência de lesões na carcaça e qualidade da carne de peito de frangos de corte. **Rev. Bras. Ciên. Avíc.**, v. 4, p. 275-282, 2002.

GERMON, P.; CHEN, Y.; HE, L.; BLANCO, J. E.; BRÉE, A.; SCHOULER, C.; HUANG, S-H.; MOULIN-SCHOULEUR, M. ibeA, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*.**Microbiology**, v. 151, p. 1179–1186, 2005.

GIROTTO, A. F.; AVILA, V. S. Embrapa: Sistemas de produção de frangos de corte: Importância econômica. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaodeFrangodeCorte/Importancia-economica.html>. Acesso em: 05 mar. 2013.

GLÜNDER, G. Dermatitis in broilers caused by *Escherichia coli:* isolation of *Escherichia coli* from field cases, reproduction of the disease with *Escherichia coli* O78:K80 and conclusion under consideration of predisposing factors. **J. Veterin, Med.**, v. 37, p. 383-391, 1990.

GOMIS, S. M.; WATTS, T.; RIDDELL, C.; POTTER, A. A.; ALLAN, B. J. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. **Avian Dis**., v. 41, p. 234-240, 1997.

GOMIS, S. M.; GOMIS, A. I. U.; HORADAGODA, N. U.; WIJEWARDENE, T. G.; ALLAN, B. J.; POTTER, A. A. Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in Broilers in Sri Lanka. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, p. 341-351, 2000.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 3, p. 335-343, 2007.

HORN, F.; CORRE, A. M. R.; BARBIERI, N. L.; GLODDE, S.; WEYRAUCH, K. D.; KASPERS, B.; DRIEMEIER, D.; EWERS, C.; WIELER, L. H. Infections with Avian Pathogenic and Fecal Escherichia coli Strains Display Similar Lung Histopathology and Macrophage Apoptosis. **PLoS One**, v. 7, p. e41031, 2012.

JEFFREY, J. S.; CHIN, R. P.; SINGER, R. S. Assessing Cellulitis Pathogenicity of *Escherichia coli* Isolates in Broiler Chickens Assessed byan in vivo Inoculation Model. **Avian Diseases**, v. 43, p. 491-496, 1999.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis**., v. 181, p. 261–272, 2000.

JOHNSON, J. R.; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M.; STELL, A. L., Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 78–88, 2001a.

JOHNSON, L. C.; BILGILI, S. F.; HOERR, F. J.; MCMURTREY, B. L.; NORTON, R. A. The influence of *Escherichia coli* strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulites. **Avian Pathology**, v. 30, p. 475-478, 2001b.

JOHNSON, J. R.; GAJEWSKI, A.; LESSE, A. J.; RUSSO, T. A., Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5798–5802, 2003.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; SMITH, K.; O'BRYAN, T. T.; TATINI, S. Antimicrobial-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 1040-1049, 2005.

JOHNSON, T. J.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S. J.; DOETKOTT, C.; SKYBERG, J. A.; LYNNE, A. M.; JOHNSON, J. R.; NOLAN, L. K. The Genome Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1:H7 Shares Strong Similarities with Human Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Genomes.**Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 3228–3236, 2007a.

JOHNSON, J. R.; SANNES, M. R.; CROY, C.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M. A.; BENDER, J.; SMITH, K. E.; WINOKUR, P. L.; BELONGIA, E. A. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products,Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. **Emerg**. **Infect**. **Dis**., v. 13, p. 838–846, 2007b.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, S. J.; STELL, A. L.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, J. R.; KIM, K. S.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L. K. Comparison of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains from Human and Avian Sources Reveals a Mixed Subset Representing Potential Zoonotic Pathogens.**Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 7043–7050, 2008.

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

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**., v. 6, p. 239-257, 1972.

KUMOR, L. W.; OLKOWSKI, A. A.; GOMIS, S. M.; ALLAN, B. J. Cellulitis in Broiler Chickens: Epidemiological Trends, Meat Hygiene, and Possible Human Health Implications. **Avian Diseases**, v. 42, p. 285-291, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LINTON, A. H.; HOWE, K.; BENNETT, P. M.; RICHMOND, M. H.; WHITESIDE, E. J. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 43, p. 465-469, 1977.

MALEFYT, R. W.; ALARCON, B.; YSSEL, H.; SANCHO, J.; MIYAJIMA, A.; TERHORST, C. P.; SPITS, H.; VRIES, J. E. Introduction of T cell receptor (TCR)-alpha cDNA has differential effects on TCR-gamma delta/CD3 expression by PEER and Lyon-1 cells. **J Immunol.**, v.142, p. 3634-3642, 1989.

MESSIER, S.; QUESSY, S.; ROBINSON, Y.; DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ, J.; FAIRBROTHER, J. M. Focal Dermatitis and Cellulitis in Broiler Chickens: Bacteriological and Pathological Findings. **Avian Diseases**, v. 37, p. 839-844, 1993.

MIGLIORANZA, S. G. **Influência da reutilização da cama aviária na condenação ao abate de frangos de corte**. 2011. 39 f. Monografia (Especialização "Lato Sensu" em Gestão da Cadeia Avícola) – Universidade Tuiuti do Paraná, Cascavel, 2011.

MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON. E. Z. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol**., v. 43, p. 66–73, 2005.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p. 465-470, 2005.

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

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T. A.; STEHLING, E. G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W. D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesq. Vet. Bras**., v. 29, p. 479-486, 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Ver**., v. 11, p. 142–201, 1998. Published erratum appears in **Clin Microbiol Ver.,** v. 11, p. 403, 1998.

NETO, A. A. A.; MIRANDA, C. C. M. **Inspeção de Aves**. 2009. 76 f. Monografia (Especialização "Lato Sensu" em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2009.

NORTON, R. A. Avian cellulitis. **World's Poultry Science Journal**, v. 53, p. 337-349, 1997.

NORTON, R. A.; BILGILI, S. F.; MCMURTREY, B. L. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. **Avian Dis**., v. 41, p. 422-428, 1997.

NORTON, R. A.; HESS, J. B. Cellulitis in broiler chickens. **World´s Poultry Science Journal**., v. 12, p. 56-59, 1999.

ONDERKA, D. K.; HANSON, J. A.; MCMILLAN, K. R.; ALLAN, B. *Escherichia coli* associated cellulitis in broilers: correlation with systemic infection and microscopic visceral lesions, and evaluation for skin trimming. **Avian Dis**., v. 41, p. 935-940, 1997.

ORDERKIRK, A. Broiler cellulits. **Poultry Service Industry**, 1997. Disponível em: <www.gov.ns.ca/nsaf/elibrary//archive/lives/poultry/broilers/cellulit>. Acesso em: 17 ago. 2013.

OLKOWSKI, A. A.; WOJNAROWICZ, C.; CHIRINO-TREJO, M.; WURTZ, B. M.; KUMOR, L. The role of first line of defence mechanisms in the pathogenesis of cellulitis in broiler chickens: skin structural, physiological and cellular response factors. **Journal Veterinary Medicine**, v. 52, p. 517-524, 2005.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq. Gastroenterol**., v. 38, p. 138-144, 2001.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. **Infect. Immun**., v. 71, p. 5087-5096, 2003.

PEIGHAMBARI, S. M.; VAILLANCOURT, J. P.; WILSON, R. A.; GYLES, C. L. Characteristics of Escherichia coli isolates from avian cellulitis. **Avian Dis**., v. 39, p. 116-124, 1995a.

PEIGHAMBARI, S. M.; JULIAN, R. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* cellulitis: experimental infections in broiler chickens. **Avian Dis**., v. 39, p. 125-134, 1995b.

PICARD, B.; GARCIA, J. S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun**., v. 67, p.546–553, 1999.

QUEL, N. G. **Estudo dos efeitos intracelulares induzidos por Vat (Vacuolating autotransporter toxin), produzida por *Escherichia coli* associada à celulite aviária**. 2010. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, 2010.

QUEL, N. G.; ARAGÃO, A. Z. B.; SALVADORI, M. R.; FARIAS, A. S.; JOAZEIRO, P. P.; SANTOS, L. M. B.; SÁ, L. R. M.; FERREIRA, A. J. P.; YANO, T. Cellulitis lesions

in broiler chickens are induced by *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF).**Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 866–872, 2013.

RANDALL, C. J.; MEAKINS, P. A.; WATT, D. J. A new skin disease in broilers. **Vet. Rec**., v. 114, p. 246, 1984.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **Int Rev Cytol**., v. 202, p. 159-242, 2001.

RENESTO, P.; SAMSON, L.; OGATA, H.; AZZA, S.; FOURQUET, P.; GORVEL, J. P.; HEINZEN, R. A.; RAOULT, D. Identification of two putative rickettsial adhesins by proteomic analysis. **Res Microbiol**., v. 157, p. 605-612, 2006.

Revista Produção Animal – Avicultura - AviSite. 37 ed. Maio 2010. Disponível em: <www.avisite.com.br/revista>. Acesso em: 25 fev. 2013.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, 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**, v. 151, p. 2097–2110, 2005.

RON, E. Z. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, p. 28–32, 2006.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli:* ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p. 1753–1754, 2000.

SALVADORI, M. R.; YANO, T.; CARVALHO, H. F.; PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Dis**, v. 45, p. 43-51, 2001.

SALVADORI, M. R. **Purificação e caracterização da ciototoxina vacuolizante (ECVF) produzida por amostras de Escherichia *coli* isoladas de celuilite aviária**. 2003. 109 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas,Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SANTANA, A. P.; MURATA, L. S.; FREITAS, C. G.; DELPHINO, M. K.; PIMENTEL, C. M. Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in State of Goiás, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2587-2592, 2008.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**., v. 45, p. 528-537, 2000.

SCHERER FILHO, M. W. **Análise dos fatores que influenciam na condenação de carcaças inteiras de frango (griller)**. 2009. 53 f. Trabalho de conclusão de curso

(Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SCHRADER, J. S.; Singer, R. S.; Atwill, E. R. A Prospective study of management and litter variables associated with cellulitis in california broiler flocks. **Avian Diseases**, v. 48, p. 522-530, 2004.

SEWALD, X.; GEBERT-VOGL, B.; PRASS, S.; BARWIG, I.; WEISS,E.; FABBRI, M.; OSICKA, R.; SCHIEMANN, M.; BUSCH, D.; SEMMRICH, M.; HOLZMANN, B.; SEBO, P.; HAAS, R. Integrin Subunit CD18 Is the T-Lymphocyte Receptor for the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. **Cell Host & Microbe**, v. 3, p. 20–29, 2008.

SHOOTER, R. A.; ROUSSEAU, S. A.; MARY COOKE, E.; BREADEN, A. L. Animal sources of common serotypes of *Escherichia coli* in the food of hospital patients possible significance in urinary-tract infections. **The Lancet**, v. 296, p. 226-228, 1970.

SILVA, E. N.; MOTA, M. P. **Celulite em frangos de corte**. 2003. Disponível em: <http://www.fatec.com.br/trabtec/celulite_em_frangos_de_corte.htm>. Acesso em: 27 fev. 2013.

SINGER, R. S.; JEFFREY, J. S.; CARPENTER, T. E.; COOKE, C. L.; CHIN, R. P.; ATWILL, E. R.; HIRSH, D. C. Spatial heterogeneity of *Escherichia coli* DNA fingerprints isolated from cellulitis lesions in chickens. **Avian Dis**., v. 43, p. 756-762, 1999.

SINGER, R. S.; JEFFREY, J. S.; CARPENTER, T. E.; COOKE, C. L.; ATWILL, E. R.; JOHNSON, W. O.; HIRSH, D. C. Persistence of cellulitis-associated *Escherichia coli* DNA fingerprints in successive broiler chicken flocks. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 59-71, 2000.

SKYBERG, J. A.; JOHNSON, T. J.; JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C.; LOGUE, C. M.; NOLAN, L. K. 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.**, v. 74, p. 6287–6292, 2006.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual**. 2001. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/1ee91c65c7752a5548bb5ca4c5af50b6.pdf> Acesso em: 25 fev. 2013.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual**. 2012. Disponível em: <http://www.brazilianchicken.com.br/files/publicacoes/d220421fe22b294a31a584138b5fda95.pdf> Acesso em: 27 fev. 2013.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual**. 2013. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf> Acesso em: 07 out. 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). 2008. Disponível em: <www.usda.gov> Acesso em: 23 mar. 2013.

ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I. ; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; PULICI, S. C. P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 283-286, 2004.

ZAVALLA, G. Manejo de problemas locomotores em reprodutoras pesadas. **Prevent News**, v. 3, p. 1-3, 2000.

APÊNDICE – ARTIGO DE PERIÓDICO

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

Veterinary Microbiology 162 (2013) 866–872

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Cellulitis lesions in broiler chickens are induced by *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF)

N.G. Quel [a,1], A.Z.B. Aragão [a,1], M.R. Salvadori [a], A.S. Farias [a], P.P. Joazeiro [b], L.M.B. Santos [a], L.R.M. Sá [c], A.J.P. Ferreira [c], T. Yano [a,*]

[a] Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, SP, CEP 13083-862, Brazil

[b] Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, SP, CEP 13083-862, Brazil

[c] Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, CEP 05508-270, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 June 2012
Received in revised form 26 October 2012
Accepted 4 November 2012

Keywords:
APEC
Avian cellulitis
Escherichia coli Vacuolating Factor (ECVF)
Purification
Cytokines
Inflammatory response
Dermatopathology

ABSTRACT

Escherichia coli Vacuolating Factor (ECVF) is a heat-labile, vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *E. coli* (APEC) isolated from avian cellulitis lesions. In this report, we intend to demonstrate that purified ECVF induces the inflammatory process of cellulitis. Our group is the first to demonstrate the effect of ECVF in a histological analysis by in situ inoculation of broiler chickens with purified ECVF. The animals were inoculated with the APEC AC53 and with purified ECVF subcutaneously on their ventral surface (in the sternum region). The histological analysis showed different grades of an acute inflammatory response in the epidermis, dermis and panniculus. An increase in mRNA expression of the proinflammatory cytokine TNF-α was also demonstrated in the inflamed tissue. When ECVF was systemically administered, increased levels of TNF-α and IL-10 were observed in the serum. These results suggest that ECVF plays a key role in the inflammatory process associated with cellulitis that is mainly mediated by TNF-α. In addition, this inflammation can be downregulated by the anti-inflammatory cytokine IL-10.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Cellulitis has emerged as an economically important syndrome in broiler chickens over the last years. Cellulitis was initially reported by Randall et al. in England (1984) and refers to the inflammation of subcutaneous tissue, mainly observed on the lower abdomen and thigh. *Escherichia coli* has been reported to be the predominant microorganism isolated from cellulitis lesions in previous studies (Gomis et al., 1997; Norton et al., 1997; Jeffrey et al., 1999). The development of the disease may be associated with skin surface injuries, which may be caused by close contact among birds and litter quality.

The ECVF produced by *E. coli* isolated from avian cellulitis (Peighambari et al., 1995) has been described previously (Salvadori et al., 2001). Later, Parreira and Gyles (2003) described the genetic background of another toxin, on a 22,139-bp pathogenicity island (PAI) of an APEC strain encoding an autotransporter protein, which induced the formation of intracellular vacuoles in chicken embryonic fibroblast (CEF) cells, and called it Vat. The vacuolization induced by Vat is specific for avian cells, such as the ECVF effects. Vat is a member of the subfamily of autotransporter proteins known as serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATE) (Parham et al., 2005), characterized by the presence of GDSGS motifs located in their passenger domains (Dutta et al., 2002; Kostakioti and

* Corresponding author at: Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Cidade Universitária "Zeferino Vaz" 13083-862 Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 3521 6254; fax: +55 19 3521 6276.
E-mail address: tyano@unicamp.br (T. Yano).

[1] These authors contributed equally.

0378-1135/$ – see front matter © 2012 Published by Elsevier B.V.
http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.007

Stathopoulos, 2004). However, ECVF characterization remains unknown.

Virulence factors, such as iron acquisition systems, adhesins and cytotoxins (Ewers et al., 2004) may contribute to enhancing the ability of pathogenic *E. coli* to grow within the subcutaneous tissues of broilers (Ngeleka et al., 1996). However, the mechanisms involved in the development of cellulitis are unclear. Our objectives, in the present study, were to determinate the role of ECVF in the cellulits inflammatory process, by analysis of histological alterations, TNF-α mRNA expression levels in inflamed tissue and the TNF-α and IL-10 levels in broiler chicken sera.

2. Materials and methods

2.1. Production and purification of ECVF

E. coli AC53 (serogroup O21,83) (Peighambari et al., 1995), which was originally isolated from cellulitis lesions on chickens in Canada, was kindly provided by Dr. C.L. Gyles and was used as the positive reference strain for ECVF production in this study (Salvadori et al., 2001). Briefly, *E. coli* AC53 was cultivated in Luria Broth (LB) medium at 37 °C with shaking at 100 rpm, the culture supernatant was fractionated using 60% ammonium sulfate, and the pellet was resuspended in 60 mM Tris–HCl, pH 7.4. The sample was applied to a HiTrap Phenyl Fast Flow (low sub) hydrophobic interaction chromatography column (Pharmacia GE Healthcare Co., Sweden), then equilibrated with 60 mM Tris–HCl and 1 M ammonium sulfate at pH 7.4, and the proteins were eluted with 60 mM Tris–HCl at pH 7.4. As a final purification step, the sample was applied to a size exclusion chromatography column (Superdex 75 HR 10/30, Pharmacia GE Healthcare Co., Sweden) in FPLC (ÄKTA GE Healthcare, Sweden). The purity of the toxin was assessed on a silver-stained sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel. The protein concentration was measured using the Bradford Bio-Rad Protein assay according to the manufacturer's instructions.

2.2. Cell culture

To ensure the maintenance of ECVF activity during the purification process, we performed cytotoxicity assays using CEF (chick embryo fibroblast) cells, which were kindly provided by the Fort Dodge Laboratory (Pfizer Animal Health). The cells were cultured in 96-well plates (Techno Plastic Products, Switzerland) in Eagle's minimal essential medium (EMEM, Nutricell, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, St. Louis, MO) and 1% of an antibiotic solution (100,000 U/L penicillin and 10 mg/L streptomycin, Sigma, St. Louis, MO) incubated in 5% CO_2 atmosphere (Jouan, France) at 37 °C until a confluent monolayer was formed. Aliquots of AC53 supernatant and of each purification stage were incubated with CEF cells and we observed the formation of vacuoles and cell death during 24 h in optical microscopy.

2.3. Animal use and care

For histological analysis and real-time PCR (qPCR) assays, six 40-day-old broiler chickens were used for each assay. The animals were kindly provided by SEARA S.A. (Marfrig Group) and were maintained in individual cages, fed a commercial ration and had unrestricted access to water. They were also allowed to acclimatize for two days prior to the initiation of the experiment. As negative controls, PBS and *E. coli* K-12 culture diluted in PBS were used. As a positive control, a culture of *E. coli* AC53 isolated from avian cellulitis was used. To test our hypothesis, the chickens were inoculated with ECVF at concentrations of 0.001 mg/mL, 0.01 mg/mL and 1 mg/mL. The chickens were inoculated subcutaneously on their ventral surface in the sternum region with 1 mL of each solution. The animals were then maintained for six days after inoculation and observed daily, after which they were euthanized via carbon dioxide asphyxiation. Skin fragments were removed for histological analysis and qPCR assay. For cytokines release assay, were used eighteen 30-days-old Leghorn male broiler chickens (kindly provided by Livet Laboratory, Campinas, São Paulo, Brazil). The assay was repeated twice, the chickens were inoculated i.v. with 1.0 ml with ECVF at concentration of 0.001 mg/mL in 60 mM Tris–HCl buffer at pH 7.4. Four animals inoculated with 60 mM Tris–HCl buffer alone and four without inoculations served as control. The blood of these animals was collected by venous puncture at intervals of 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 and 48 h after inoculation, and stored overnight at 4 °C to obtain the serum. The experimental use of chicken was approved by 2089-1 Institutional Animal Care and Use Committee methods in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation (COBEA).

2.4. Histological analysis

Skin and subcutaneous fragments from the inoculation sites in the sternum were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, embedded in paraffin, cut into 4 μm thick slices and stained with hematoxylin and eosin (HE) for light microscopy (Behmer et al., 1976). The slides were blind-examined by a pathologist. To determine the statistically significant differences among treated groups and controls, we counted the defense cells present in six fields of each slide.

2.5. Expression of TNF-α mRNA

The expression of TNF-α mRNA was measured via quantitative qPCR. Total RNA was extracted using Trizol and reverse transcribed to generate cDNA. Taqman analysis was performed using a Taqman ABI Prism 7500 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The primers were obtained from Applied Biosciences for β-actin (product number Gg03815934_s1; GenBank access: L08165.1) and for TNF-α (product number Gg03354884_m1; GenBank access: AJ851702.1). The specific mRNAs were normalized to the expression of a housekeeping gene (β-actin) as previously described (Zhou et al., 2011). The data were obtained using independent duplicate measurements. The threshold cycle value of the individual measurements did not exceed 0.5 amplification cycles.

2.6. Cytokines release assay

To determine the release of cytokines by broiler chickens, the serum were centrifuged at 10,000 × g for 15 min to remove any precipitate material and filtered with a 0.22 μm filter (Millipore, USA) and stored at −20 °C. TNF-α and IL-10 ELISA commercial kits (Bio-Source International, USA) were used for quantification of the cytokines in the serum of the broiler chickens inoculated with ECVF. The experiments were performed according to the manufacturer's protocol.

2.7. Statistical analysis

For the statistical analysis we performed one-way ANOVA followed by Tukey's test to determine the confidence level of the findings using GraphPad Prism version 5 for Windows ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Production and purification of ECVF

ECVF was purified through two chromatography steps (Fig. 1A and B), as described above, and its purity was verified by detecting a single protein band with a molecular weight of 56 kDa following SDS-PAGE (Fig. 1C). The biological activity of the purified ECVF was confirmed in CEF cell cultures (Fig. 1D).

3.2. Gross and histological analyses

The gross findings (data not shown) consist of slight edema at the inoculation site in the ECVF groups and moderate edema in the negative control K12 group. The positive control (*E. coli* AC53) showed typical cellulitis lesions with edema, hemorrhage and fibrinous to caseous exudates at the inoculation site. There were no lesions associated with inoculation using the PBS negative control. When compared to the negative groups, microscopic analysis revealed different levels of epidermal changes characterized by basket-wave and segmental compact orthokeratotic hyperkeratosis in the epidermal layer and a lack of skin folds, edema and perivascular inflammation in the dermis and panniculus of ECVF-treated animals ($p < 0.0001$). In the 0.001 mg ECVF-treated group, mild lesions were observed in the epidermis, dermis and panniculus (data not shown). In the 0.01 mg ECVF-treated group, were observed similar epidermal alterations. In the dermis, there were also an increased number of superficial vessels, which were dilated and congested. Some capillaries showed leukostasis, and a mild perivascular mononuclear and heterophil inflammatory infiltrates were detected. In the panniculus, which consists of subcutaneous fat, there were also lymphocytes, heterophils and plasma cell infiltrates distributed in perivascular and lobular sections

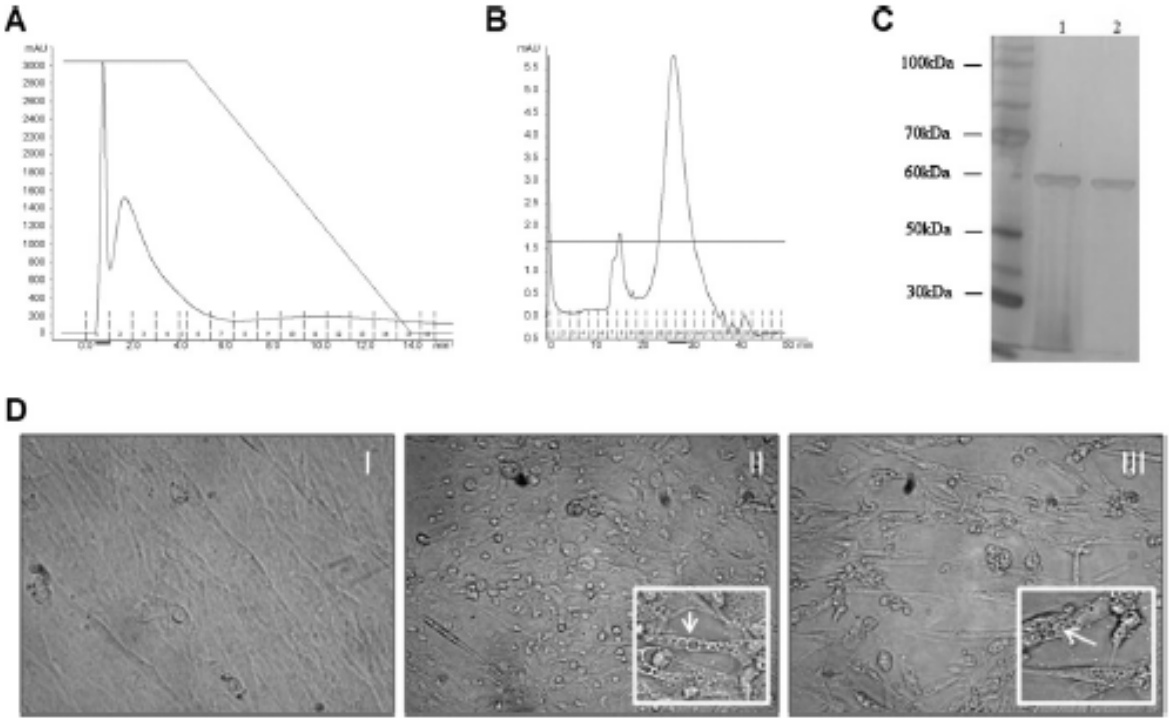


Fig. 1. Purification of ECVF. (A) Purification of ECVF through hydrophobic interaction HiTrap Phenyl Fast Flow (low sub) column. Protein was eluted at 0.75 min. (B) Second step purification of ECVF through size exclusion in a Superdex 75 HR 10/30 column. Protein was eluted at 26.82 min. (C) Silver-stained sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel for assessing the purity of the obtained toxin. Columns 1 and 2 corresponding to protein eluted from a hydrophobic interaction and size exclusion, respectively. (D) Biological activity of purified ECVF assayed in CEF cell cultures. (I) Negative control of CEF cells (200×); (II) *E. coli* AC53 supernatant-induced cytoplasmic vacuolization (200×); and (III) purified ECVF-induced cytoplasmic vacuolization after 18 h of treatment (200×). Arrows indicate vacuoles.

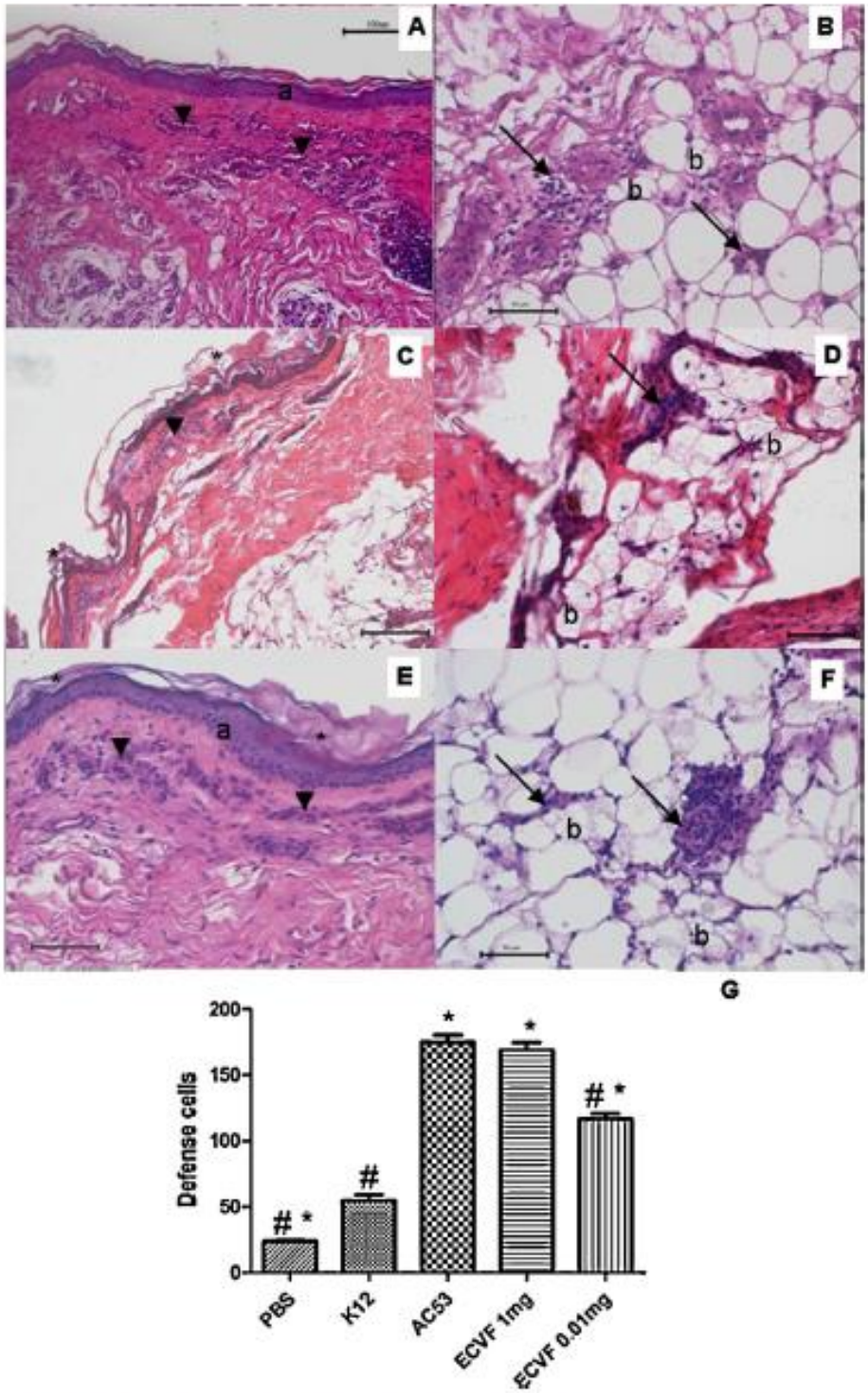


Fig. 2. Histological analysis of skin and subcutaneous fragments of broiler chickens, treated with *Escherichia coli* AC53 (positive control) in 200× (A) and 400× (B), and with ECVF at different concentrations, which means 0.01 mg in 200× (C) and in 400× (D), and 1 mg in 200× (E) and in 400× (F). Asterisk indicate basket-wave orthokeratotic hyperqueratosis; arrow head indicate dilatated and congested vessels, which means edema; arrow indicate lymphocytes, heterophile and plasma cells infiltrate in the panniculus, which were distributed perivascular and lobular; "a" indicates epidermal hyperplasia with four to fiven ucleated layers; "b" indicates multinucleated fat cells. (G) Data are shown as means and S.D. from 6 fields of defense cells counted. *Statistically significant differences ($p < 0.0001$) compared to K12 (negative control) and #statistically significant differences ($p < 0.0001$) compared to AC53 (positive control).

(Fig. 2C and D). These findings were very similar to what was observed in the K12 group. In the 1 mg ECVF group, were observed similar lesions in the epidermal layer and dermis. The inflammatory infiltrate increased the width of the panniculus, where the subcutaneous fat contained multinucleated fat cells. These alterations are characteristic of dermatitis and panniculitis (acute cellulitis) (Fig. 2E and F). The positive control group (*E. coli* AC53) showed moderate acanthosis and equivalent epidermal lesions observed in the other groups. There were also vessels lesions and an increase in densely packed collagen bundles in the dermis. Additionally, dermal lesions were also very similar (Fig. 2A and B). However, the panniculus exhibited fibrin, necrosis and perivascular inflammatory infiltrates associated with severe fibringranulomatous, i.e., heterophil infiltrates surrounded by multinucleated giant cells and fibrosis (severe cellulitis) (data not shown).

3.3. TNF-α analysis

We analyzed the expression of TNF-α in the cellulitis lesions. Fig. 3A shows the increase in the expression of TNF-α when *E. coli* AC53 or the ECVF cytotoxin was injected into the animals in comparison to the control groups ($p < 0.0036$).

3.4. Cytokines release assay

To confirm that the increase in the expression of TNF-α was due to ECVF cytotoxin, we quantified the release of TNF-α in the sera of animals injected with ECVF cytotoxin. It was observed that the ECVF cytotoxin stimulates the release of the inflammatory cytokine TNF-α (Fig. 3B), which was not detected in the control group. Moreover, the cytotoxin also increases the production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, which downregulated the production of TNF-α.

4. Discussion

Our group was the first one to reproduce cellulitis lesions using the purified ECVF toxin. Parreira and Gyles (2003) demonstrated that *E. coli* Ec222, which contains *vat* encoded gene could cause cellulitis in contrast with its *vat* deletion mutant Ec222VPΔ2, and that supernatants of Ec222 and *E. coli* XL10/pVP16-85, containing de *vat* ORF, induced intracellular vacuolization in CEF cells. These authors suggest that Vat is important to APEC pathogenicity. The predicted Vat cytotoxin domain had 111.8 kDa, but our purified ECVF toxin has 56 kDa. This discrepancy and the data generated by mass spectrometry analysis (data not shown) led us to believe

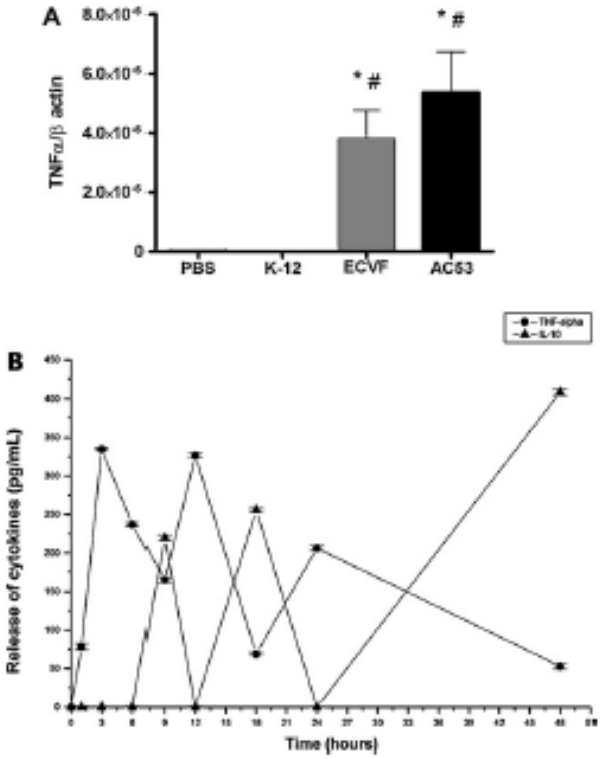


Fig. 3. Analysis of TNF-α expression in the cellulitis lesions. (A) TNF-α mRNA expression of in chicken tissue after injection (PBS, K-12, ECVF or *E. coli* AC53). Data are shown as ratio of TNF-α/β actin from triplicate (means and SD). *Statistically significant differences ($p < 0.0036$) compared to PBS and #statistically significant differences ($p < 0.0036$) compared to K12. (B) Kinetics of TNF-α and IL-10 in chicken serum following ECVF injection.

that these proteins are different, although they have similar functions.

Previous works reproduced the cellulitis lesions using intact *E. coli* (Peighambari et al., 1995; Gomis et al., 1997; Norton et al., 1997). These other authors observed the presence of infiltrates of defense cells, such as heterophils, macrophages and plasma cells. These results are similar to our findings following inoculating chickens with purified ECVF, which confirms that the observed alterations are actually cellulitis lesions. We demonstrated that of the tested substances, only the purified ECVF toxin is capable of causing the development of microscopic lesions ($p < 0.0001$). This type of microscopic alteration was also observed in chickens (Messier et al., 1993; Fallavena et al., 2000) and turkeys (Carr et al., 1996) obtained from poultry farms affected by avian cellulitis. It has been suggested that macroscopic lesions are not as important for the diagnosis of avian cellulitis because they are not specific for subcutaneous edema; therefore, the microscopic alterations are definitive for diagnosis (Henderson et al., 2004). Consequently, the fact that ECVF did not induce gross lesions was not relevant because the appropriate microscopic alterations were present.

Some authors have also observed such microscopic changes at the histological level, in skin and subcutaneous fat fragments associated with avian cellulitis, including thickening of the dermis (Norton et al., 1997; Jeffrey et al., 1999), moderate hyperkeratosis, hyperplasia of the epidermis, neovascularization (Messier et al., 1993) and infiltration of mononuclear cells and heterophils (Onderka et al., 1997). These alterations were very similar to our results. However, they differ from what was observed in the positive controls and compared to the fibrocaseous granulomatous plaques surrounded by a capsule of connective tissue containing inflammatory cells, rows of multinucleated giant cells and macrophages (Fallavena et al., 2000) and the invasion of adjacent muscular tissue by inflammatory cells and the occurrence of congestion of the capillaries observed in previous studies (Onderka et al., 1997). In addition to the morphological alterations detected, we were able to demonstrate an increase in the expression of TNF-α mRNA in the inflamed tissue. The specific mechanisms by which ECVF acts have not yet been defined, but induction of TNF-α production may be the main mechanism of cytotoxicity observed during cellulitis. TNF-α can mediate leukocyte recruitment, permeability changes and edema formation (Onderka et al., 1997). Moreover, the cytotoxic vacuolation previously described for ECVF may be due to the induction of apoptosis by TNF-α, as this cytokine is also involved in this mechanism (Laster et al., 1988).

We detected an increase in the production of TNF-α in the serum as well, suggesting that ECVF may induce a systemic increase of this proinflammatory cytokine. The time course of the release of TNF-α in the broiler chickens studied here was similar to that required for the development of the cellulitis lesions in avians inoculated with *E. coli* for the purpose of experimental reproduction of cellulitis (Peighambari et al., 1995; Gomis et al., 1997; Norton et al., 1997).

Under inflammatory conditions, in which there is increased production of cytokines with proinflammatory potential, there is also an increase in the production of cytokines with immunoregulatory properties, such as IL-10 (Malefyt et al., 1989). Thus, the endogenous regulation of proinflammatory cytokine production is of critical importance in determining the magnitude of an inflammatory response. In the present study, it was clearly demonstrated that administration of ECVF also induced production of IL-10, which downregulated the levels of TNF-α. IL-10 produced by macrophages and T cells is generally considered to fulfill a primarily anti-inflammatory role and possess macrophage-deactivating properties, including downregulation of MHC class II expression and TNF-α production (Moore et al., 1993). A protective role of IL-10 in experimental toxemia has also been demonstrated. BALB/c mice subjected to LPS-induced toxic shock were rescued by IL-10 administration, and the increase in this cytokine was correlated with reduction in the serum levels of TNF-α (Gerard et al., 1993). Inhibition of TNF-α production during experimental toxemia has also been observed following IL-10 administration in baboons and humans (Pajkrt et al., 1997; Weinrauch and Zychlinsky, 1999). Moreover, similarly to the data presented in Fig. 3, previous reports have demonstrated that administration of an endotoxin induced IL-10 production in experimental animals and humans, thus suggesting that endogenous IL-10 confers significant protection against the harmful effect of toxins and reduces TNF-α levels (Standiford et al., 1995). Hence, IL-10 production may limit both macrophage- and lymphocyte-mediated immune responses in the local inflammatory environment.

5. Conclusion

In summary, we confirmed that ECVF is a virulence factor involved in the pathogenesis of cellulitis. Additionally, we showed that inoculation of chickens with this cytotoxin induces inflammatory lesions in the dermis and subcutaneous fat that may contribute to increasing serum levels of TNF-α and IL-10. IL-10 controls the cascade of events initiated by the inflammatory response, indicating the immunomodulatory properties of the ECVF cytotoxin.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 00/06841-7). We thank Dr. Adriana F. Paes Leme (Mass Spectrometry Laboratory, LNBio) for the important MS analysis and Ana Stella M. Degrossoli, Romênia R. Domingues and Bianca A. Pauletti for the technical support.

References

Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G., 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. Edart, São Paulo, p. 315.

Carr, D., Shaw, D., Halvorson, D.A., Rings, B., Roepke, D., 1996. Excessive mortality in market-age turkeys associated cellulites. Avian Dis. 40, 736–741.

Dutta, P.R., Cappello, R., Navarro-García, F., Nataro, J.P., 2002. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. Infect. Immun. 70, 7105–7113.

Ewers, C., Janben, T., Kiebling, S., Philipp, H.C., Wieler, L.H., 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Vet. Microbiol. 104, 91–101.

Fallavena, L.C.B., Moraes, H.L.S., Salle, C.T.P., Silva, A.B., Vargas, R.S., Nascimento, V.P., Canal, C.W., 2000. Diagnosis of skinlesions in condemned or downgraded broiler carcasses – a microscopic and macroscopic study. Avian Pathol. 29, 557–562.

Gerard, C., Bruyns, C., Marchand, A., Abramo wicz, D., Vandenabeele, P., Delvaux, A., Fiers, V., Goldman, M., Velu, M., 1993. Interleukin-10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. J. Exp. Med. 177, 547–550.

Gomis, S.M., Watts, T., Riddell, C., Potter, A.A., Allan, B.J., 1997. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. Avian Dis. 41, 234–240.

Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R., Ala'Aldeen, D., 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68, 692–744.

Jeffrey, J.S., Chin, R.P., Singer, R.S., 1999. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. Avian Dis. 43, 491–496.

Kostakioti, M., Stathopoulos, C., 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Infect. Immun. 72, 5548–5554.

Laster, S.M., Wood, J.G., Gooding, L.R., 1988. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic form of cell lysis. J. Immun. 141, 2629–2635.

Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., De Vries, J.E., 1989. Interleukin 10 (IL 10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL10 produced by monocytes. J. Exp. Med. 17, 1209–1220.

Messier, S., Quessy, S., Robinson, Y., Devriese, L.A., Hommez, J., Fairbrother, J.M., 1993. Focal dermatitis and cellulitis in broiler chickens: bacteriological and pathological findings. Avian Dis. 37, 839–844.

Moore, K.W., OóGarra, A., Malefyt, R.W., Vieira, P., Mosmann, T.R., 1993. Interleukin-10. Annu. Rev. Immunol. 11, 165–190.

Ngeleka, M., Kwaga, J.K.P., White, D.G., Whittam, T.S., Riddell, C., Goodhope, R., Potter, A.A., Allan, B., 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. Infect. Immun. 64, 3118–3126.

Norton, R.A., Bilgili, S.F., McMurtrey, B.L., 1997. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. Avian Dis. 41, 422–428.

Onderka, D.K., Hanson, J.A., McMillan, K.R., Allan, B., 1997. *Escherichia coli* associated cellulitis in broilers: correlation with systemic infection and microscopic visceral lesions, and evaluation for skin trimming. Avian Dis. 41, 935–940.

Pajkrt, D., Camoglio, L., Tiel-van Buul, M.C., de Bruin, K., Cutler, D.L., Affrime, M.B., Rikken, G., van der Poll, T., Cate, J.W., van Deventer, S.J., 1997. Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL 10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration. J. Immun. 158, 3971–3977.

Parham, N.J., Pollard, S.J., Desvaux, M., Scott-Tucker, A., Liu, C., Fivian, A., Henderson, I.R., 2005. Distributions of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 43, 4076–4082.

Parreira, V.R., Gyles, C.L., 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. Infect. Immun. 71, 5087–5096.

Peighambari, S.M., Julian, R.J., Vaillancourt, J.P., Gyles, C.L., 1995. *Escherichia coli* cellulitis: experimental infections in broiler chickens. Avian Dis. 39, 125–134.

Randall, C.J., Meakins, P.A., Watt, D.J., 1984. A new skin disease in broilers. Vet. Rec. 114–246.

Salvadori, M.R., Yano, T., Carvalho, H.F., Parreira, V.R., Gyles, C.L., 2001. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis. 45, 43–51.

Standiford, T.J., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., 1995. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein 2 and tumor necrosis factor. J. Immun. 155, 2222–2229.

Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 1999. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. Annu. Rev. Microbiol. 53, 155–187.

Zhou, G., Cai, W., Liu, X., Niu, C., Gao, C., Si, C., Zang, W., Qu, L., Han, L., 2011. A duplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction for the detection and quantitation of avian leukosis virus subgroups A and B. J. Virol. Methods 173, 275–279.