

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



**Influência do sistema biossensor de quórum via AI-2 para a
colonização do ambiente intestinal de mamíferos**

Daniel Marques

Dissertação orientada por:
Prof. Doutora Karina Xavier
Prof. Doutor Élio Sucena

**MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
E DO DESENVOLVIMENTO**

2009

Resumo

O intestino de mamíferos é habitado por comunidades de bactérias residentes. Apesar de muitas das espécies já terem sido identificadas, os mecanismos que permitem o seu estabelecimento e a sua permanência são em grande parte desconhecidos. A espécie *Escherichia coli* é uma das primeiras a colonizar o intestino de mamíferos. As bactérias desta espécie podem comunicar entre si pela produção e secreção de moléculas que são detectadas por biossensores de densidade celular. Uma destas moléculas, o autoindutor-2 (AI-2), é sintetizado e pode ser detectado por um grande número de espécies bacterianas. A detecção de AI-2 leva à expressão de genes importantes para a colonização de novos habitats, como aqueles que estão envolvidos na formação de biofilmes. Apesar de alguns estudos mostrarem que a detecção de AI-2 influencia o desenvolvimento da virulência de bactérias patogénicas, a influência deste sistema em bactérias não patogénicas permanece por explorar. Assim, procurou-se avaliar se a produção de AI-2 por estirpes não patogénicas de *E. coli* teria alguma influência na colonização do ambiente intestinal de ratinhos, e se estas bactérias apresentariam uma vantagem adaptativa durante o processo de colonização relativamente a mutantes que não produzem o sinal. Ratinhos foram inoculados com uma estirpe selvagem de *E. coli*, uma estirpe mutante que não consegue produzir o sinal AI-2, e com uma mistura 1:1 destas duas estirpes. O número de bactérias inoculadas presente nos intestinos dos animais foi determinado ao longo de quatro dias após tratamento do conteúdo das fezes através de um protocolo desenvolvido. Os resultados obtidos mostram que não houve diferenças significativas entre os níveis de colonização das estirpes inoculadas. Apesar destes resultados favorecerem a hipótese de que os biossensores de AI-2 de *E. coli* não são importantes para a colonização, serão discutidas outras explicações relacionadas com as especificidades dos sistemas de detecção de AI-2.

Palavras-chave: *intestino, microbiota, colonização, quórum, autoindutor-2*

Abstract

Mammalian intestines are populated by resident bacterial communities. Although many of these species have already been identified, the mechanisms by which they establish themselves in the intestines and persist throughout time are to a great extent unknown. *Escherichia coli* is one of the first species to colonize this environment. These bacteria can communicate by producing and secreting molecules which are in turn detected by their quorum-sensing systems. One of these molecules, the autoinducer-2 (AI-2), is synthesized and can be sensed by bacteria from a high number of species. This detection leads to the up-regulation of important genes for the colonization of new habitats, like the ones involved in biofilm assembling. Even though several studies show that AI-2-mediated quorum-sensing influences the virulence of pathogenic bacteria, its influence in non-pathogenic bacteria remains yet to be determined. In order to address this question, experiments were conducted to determine if AI-2 production by non-pathogenic *E. coli* strains would influence their colonization process in mice intestines, and if these bacteria would present any adaptive advantage during this colonization process in comparison with mutants which do not produce AI-2. Mice were either colonized with a wild-type *E. coli* strain, a mutant strain unable to produce AI-2 or a 1:1 mixture of the two abovementioned strains. Numbers of inoculated bacteria that were present in mice intestines were determined during four days by processing feces using a protocol developed for that end. There were no significant differences between the colonization levels of all inoculated strains. Even though the results favour the non-essentiality of *E. coli* AI-2-mediated quorum-sensing systems for intestinal colonization, other hypotheses will be discussed that account for the idiosyncrasies of this specific quorum-sensing system.

Palavras-chave: *intestine, microbiota, colonization, quorum-sensing, autoinducer-2*

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Introdução	
1. Considerações iniciais	5
2. Detecção de quórum em bactérias	
2.1 Comunicação entre bactérias: um novo paradigma.....	6
2.2 Funcionamento do processo de detecção de quórum	6
2.3 Mecanismo molecular da detecção de quórum: sistema LuxI-LuxR	7
2.4 O sistema LuxI-LuxR em contexto ecológico	8
2.5 Distribuição dos sistemas de detecção de quórum	8
2.6 Função ecológica dos sistemas de detecção de quórum	9
2.7 Colonização do ambiente intestinal de mamíferos.....	9
2.8 Escolha do modelo bacteriano de estudo.....	10
2.9 A detecção de quórum via AI-2	
2.9.1 Síntese do sinal AI-2.....	10
2.9.2 Estrutura do sinal AI-2.....	11
2.9.3 Comunicação interespecífica e distribuição do gene <i>luxS</i>	12
2.9.4 Regulação génica via AI-2: o operão <i>lsr</i> de <i>E. coli</i>	14
2.9.5 Funções biológicas da sinalização via AI-2 em <i>E. coli</i>	15
3. O microbioma intestinal de mamíferos	
3.1 Evolução, desenvolvimento e fisiologia do intestino	15
3.2 Colonização do ambiente intestinal.....	16
3.3 Características do microbioma adulto	17
3.4 Interações micróbio-hospedeiro	17
3.5 Evolução do desenvolvimento simbiótico	18
Materiais e métodos	
Estirpes utilizadas	19
Delecção dos genes <i>lacIZYA</i>	20
Excisão do gene de resistência a cloranfenicol	20
Preparação de lisados com bacteriófagos P1	21
Inserção de genes por transdução com o bacteriófago P1.....	21
Visualização de estirpes fluorescentes.....	21

Experiências de inoculação de ratinhos	21
Manutenção de ratinhos inoculados e recolha de fezes	22
Processamento das amostras de fezes recolhidas	23
Análise de bactérias por citometria de fluxo	23
Análise de bactérias intestinais por inoculação em placa	24
Visualização de bactérias directamente nas fezes	24
Determinação da neutralidade dos marcadores fluorescentes	25
Resultados e discussão	
Escolha do modelo biológico utilizado nas experiências de inoculação.....	26
Estratégia utilizada para construir estirpes colonizadoras.....	27
Delecção dos genes lacIZYA	27
Excisão do gene de resistência a cloranfenicol	29
Construção de estirpes fluorescentes	29
Visualização das estirpes fluorescentes construídas	29
Escolha do modelo biológico utilizado como hospedeiro.....	31
Escolha do modelo de ratinho a utilizar.....	31
Teste preliminar com estreptomicina.....	33
Efeito do tratamento de estreptomicina na microflora de ratinhos	33
Construção de estirpes resistentes à estreptomicina	35
Colonização do ambiente intestinal	36
Quantificação do nível de colonização por contagem em placa.....	39
Quantificação do nível de colonização por citometria de fluxo	41
Comparação entre métodos de quantificação	43
Visualização de bactérias directamente nas fezes	43
Verificação da neutralidade dos marcadores fluorescentes.....	45
Identificação simultânea de fluorescência de YFP e CFP.....	46
Experiência de co-colonização	48
Considerações finais.....	51
Referências bibliográficas.....	53
Anexos	
Quadros suplementares	57
Figuras suplementares.....	59
Protocolos	62

Introdução

1. Considerações iniciais

Microbiology is on the verge of a paradigm shift. The strictly Cartesian, reductionist strategy that has characterized most of twentieth century science in general and microbiology in particular has been immensely successful in generating a detailed understanding of the workings of the cell. It has faltered, however, when confronted with the problem of producing integrated explanations of the workings of the multicellular organism or of the interactions within a multimember population. (Shapiro e Dworkin, 1997)

Os resultados científicos e os melhoramentos técnicos alcançados pelos microbiólogos da segunda metade do século XIX tiveram uma grande influência na orientação da investigação em Microbiologia ao longo do século XX. O desenvolvimento de meios nutritivos, técnicas de cultivo e material apropriado para a manipulação de bactérias foram imprescindíveis para o reconhecimento do potencial patogénico de determinados micróbios e combate às doenças por eles causadas. O crescimento de bactérias em cultura pura tornou-se uma técnica importante e usual da investigação em Microbiologia (Madigan e Martinko, 2006). Porém, apesar de técnicas como esta terem sido imprescindíveis para a descoberta da cura a várias doenças infecciosas, elas só podem reproduzir as condições nas quais os microrganismos vivem na natureza de uma forma muito limitada. Na verdade, os microrganismos de uma espécie podem encontrar-se em habitats de condições físico-químicas muito diversas e que frequentemente também servem de habitat a organismos de espécies diferentes. As abordagens reducionistas foram extremamente úteis na elucidação de vários aspectos fundamentais da biologia de bactérias, como são exemplo os trabalhos de Jacob e Monod sobre os mecanismos de regulação génica em *E. coli*. Contudo, esta abordagem não está a demonstrar ser suficiente para permitir compreender os comportamentos mais complexos que resultam da proximidade física e subsequente interação entre bactérias

de espécies diferentes e entre bactérias e os seus hospedeiros eucariontes. Torna-se, portanto, necessário desenvolver abordagens mais holistas para que a compreensão de fenómenos tão complexos como os processos de comunicação intraespecíficos e interespecíficos seja tão completa quanto possível (Shapiro e Dworkin, 1997). Perspectivas deste tipo serão importantes para decifrar quais as condições que levam ao aparecimento de doenças infecciosas, o papel dos microrganismos no desenvolvimento dos seus hospedeiros eucariontes e a importância evolutiva do estabelecimento de simbioses.

2. Detecção de quórum em bactérias

2.1. Comunicação entre bactérias: um novo paradigma

Os trabalhos de investigação sobre bactérias descreveram estes organismos frequentemente como células indiferenciadas que, apesar de poderem dar origem a populações com um grande número de indivíduos, eram relativamente independentes entre si, tendo como principais actividades o seu próprio crescimento e subsequente multiplicação (Hastings e Greenberg, 1999). Nas últimas duas décadas, porém, vários estudos têm demonstrado que as bactérias podem interagir não só com o ambiente físico-químico em que se encontram, mas também com outros organismos na sua proximidade. Em resposta a estes estímulos ambientais, as bactérias podem modificar o padrão de expressão dos seus genes e alterar a sua morfologia e/ou comportamento, um fenómeno que foi designado desenvolvimento bacteriano (Straight e Kolter, 2009). Os estudos recentes acerca dos processos de comunicação entre bactérias por detecção de quórum têm sido fundamentais para esta mudança de paradigma.

2.2. Funcionamento do processo de detecção de quórum

As bactérias que possuem um biossensor de densidade celular sintetizam constitutivamente determinadas moléculas que são segregadas para o meio. À medida que a população inicial de bactérias se multiplica, a concentração extracelular das moléculas referidas aumenta proporcionalmente. Se a densidade celular se tornar muito alta, a concentração extracelular pode atingir um nível crítico, sendo detectada pelo biossensor de cada célula e desencadeando uma alteração da expressão génica ao nível

de toda a população, como se encontra esquematizado na FIGURA 1 (Bassler e Losick, 2006). As moléculas detectadas são designadas autoindutores e funcionam como sinais que contêm informação acerca da densidade celular nas regiões limítrofes à célula bacteriana (Keller e Surette, 2006).

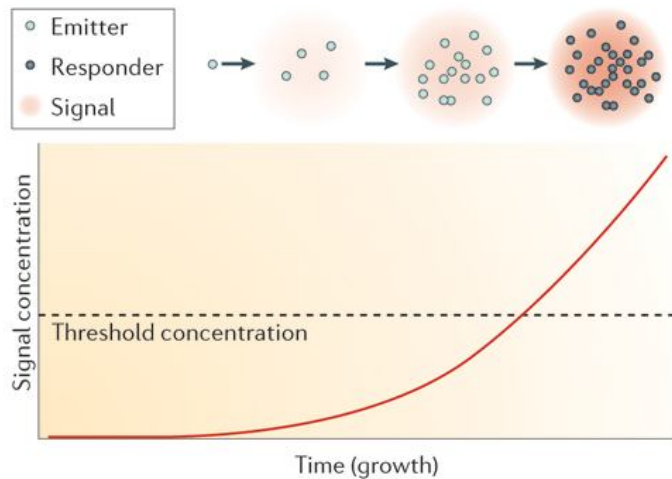
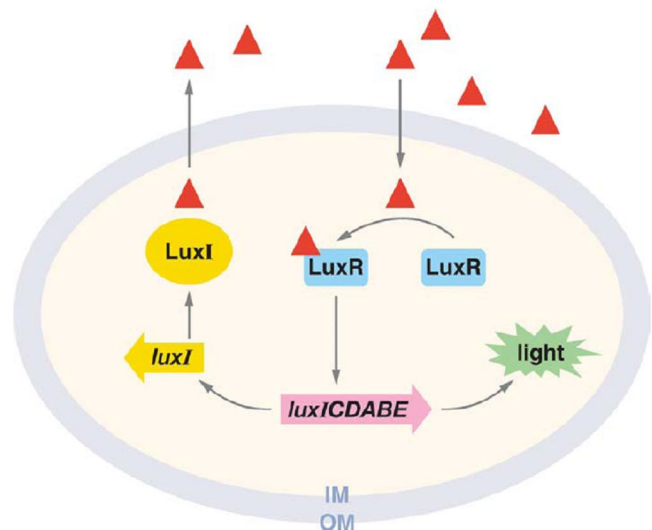


FIGURA 1 | Esquema do processo de detecção de quórum. O gráfico mostra como a acumulação extracelular de sinal é proporcional ao número de bactérias presentes no meio. O esquema mostra que só depois de a concentração crítica ser atingida é que se verifica uma resposta por parte das células bacterianas (Keller e Surette, 2006).

2.3. Mecanismo molecular da detecção de quórum: sistema LuxI-LuxR

Os mecanismos moleculares da detecção de quórum podem ser muito simples. O primeiro dos mecanismos a serem descritos foi o sistema LuxI-LuxR, que se encontra em bactérias da espécie *Vibrio fischeri* (ver FIGURA 2). Neste caso, a enzima LuxI sintetiza o autoindutor, uma AHL (do inglês *acyl-homoserine lactone*), que se difunde para o meio. Quando a concentração crítica é atingida, o sinal interage com a proteína LuxR, formando um complexo que activa a transcrição de alguns genes, entre os quais aqueles que codificam a enzima luciferase. A acção catalítica desta enzima tem como consequência a emissão de luz (Waters e Bassler, 2005).

FIGURA 2 | Mecanismo molecular da detecção de quórum em *Vibrio fischeri*. Este sistema é regulado por apenas duas proteínas: LuxI e LuxR. O autoindutor AHL (triângulos vermelhos) sintetizado por LuxI é detectado por LuxR, e é o próprio complexo LuxR-AHL que interage com o DNA da bactéria, activando a expressão do operon *lux*. A transcrição do gene que codifica LuxI também é induzida, o que cria um efeito de *feedback* positivo que tem como consequência a rápida extensão desta resposta a toda a população (Waters e Bassler, 2005).



2.4. O sistema LuxI-LuxR em contexto ecológico

As bactérias da espécie *V. fischeri* vivem no ambiente marinho do Havai. De uma maneira geral, estas bactérias correspondem a menos de 0,1% da população de bacterioplâncton. A uma densidade tão baixa como esta, a concentração crítica de sinal AHL não é atingida, e não há detecção de quórum (Nyholm e McFall-Ngai, 2004). Na verdade, densidades elevadas só são encontradas em ambientes muito particulares, como órgãos especializados dos chocos da espécie *Euprymna scolopes*, onde estas bactérias podem formar populações de 10^7 a 10^9 indivíduos (Lee e Ruby, 1994). Apenas aqui existem as condições para que a expressão dos genes necessários à emissão de luz seja induzida. Esta associação simbiótica traz vantagens para ambos os indivíduos: ao emitir luz, os chocos podem anular a sombra que projectam no solo marinho e evitar predadores durante as suas deambulações em noites de luar intenso; por outro lado, as bactérias beneficiam da existência de um meio rico em nutrientes no interior do órgão luminoso, onde se podem multiplicar muito mais rapidamente. Para além disso, a sua capacidade para colonizar novos ambientes é maior porque, todos os dias, aproximadamente 95% da população presente no órgão luminoso é expelida para a água (Nyholm e McFall-Ngai, 2004; Waters e Bassler, 2005). O carácter mutualista desta associação tem grandes implicações evolutivas. Por um lado, a existência de associações simbióticas como estas mostra que o processo evolutivo favoreceu o seu aparecimento; por outro lado, tendo em conta os processos simbióticos conhecidos, é possível observar que a existência destas associações potencia o aparecimento de novas estruturas e/ou capacidades metabólicas, o que contribui para a diversificação das espécies (Moya *et al.*, 2008).

2.5. Distribuição dos sistemas de detecção de quórum

O sistema LuxI-LuxR de *V. fischeri* foi considerado durante muito tempo um sistema de comunicação que só teria evoluído num contexto muito específico de colonização de um hospedeiro eucarionte com as características de *E. scolopes*. Porém, em 2002, já tinham sido encontrados genes homólogos a *luxI* e *luxR* em cerca de 50 espécies de bactérias Gram-negativas (Winans e Bassler, 2002). Num estudo mais recente, quando comparados 512 genomas de bactérias que foram totalmente sequenciados, 13% desse total apresentava pelo menos uma proteína homóloga a cada uma das proteínas LuxI e LuxR (Case *et al.*, 2008), o que mostra que este sistema é bastante conservado e que poderá desempenhar funções muito importantes.

2.6. Função ecológica dos sistemas de detecção de quórum

Apesar de serem necessários estudos mais aprofundados para determinar quais as possíveis funções deste sistema de detecção de quórum num contexto ecológico, já foram descobertos alguns genes regulados através deste mecanismo molecular que têm uma função ecológica importante. As bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, que podem colonizar os pulmões de pacientes com fibrose cística, são bactérias patogénicas cuja expressão de factores de virulência e maturação de biofilmes é induzida por via de um sistema de detecção de quórum homólogo a LuxI-LuxR (Winans e Bassler, 2002). A infecção de plantas pelo patogénio *Agrobacterium tumefaciens* é potenciada quando, por um mecanismo de detecção de quórum, é induzida a expressão de genes que levam à transferência do plasmídeo Ti entre bactérias, por conjugação (Winans e Bassler, 2002). A produção de factores de nodulação essenciais ao estabelecimento de uma associação simbiótica permanente entre bactérias do género *Rhizobium* e leguminosas também é induzida através de mecanismos de detecção de quórum semelhantes (Straight e Kolter, 2009). Apesar destas relações interespecíficas terem ecologias distintas, todas as bactérias mencionadas estabelecem interacções simbióticas com hospedeiros eucariontes, e o sucesso da colonização depende da coordenação de determinados comportamentos muito específicos que só se traduzem num benefício substancial para as bactérias quando levados a cabo por um grande número de indivíduos. Os sistemas de detecção de quórum constituem um mecanismo de regulação génica que possibilita essa coordenação (Waters e Bassler, 2005). As bactérias referidas são Gram-negativas, mas bactérias Gram-positivas também possuem sistemas de detecção de quórum, embora o tipo de sinais produzidos e os biossensores associados sejam distintos. Para além destas duas classes, foi descoberto outro tipo de sinal, o AI-2, que é o único autoindutor produzido por várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por este motivo, pensa-se que a molécula AI-2 possa ser utilizada em processos de comunicação entre espécies diferentes (Vendeville *et al.*, 2005).

2.7. Colonização do ambiente intestinal de mamíferos

Um dos casos em que também se estabelece uma associação simbiótica entre bactérias e um hospedeiro eucarionte é o caso da colonização do ambiente intestinal de mamíferos. Tomando como exemplo o intestino humano, este ambiente apresenta não só um número muito elevado de bactérias como também uma grande diversidade, estimada entre 500 e 1000 espécies (Kaper e Sperandio, 2005). Neste contexto, é

possível que a acção de mecanismos de detecção de quórum seja importante para a indução de comportamentos necessária à colonização do ambiente intestinal de mamíferos, à semelhança do que acontece nos processos de estabelecimento de simbioses já evidenciados (Kaper e Sperandio, 2005).

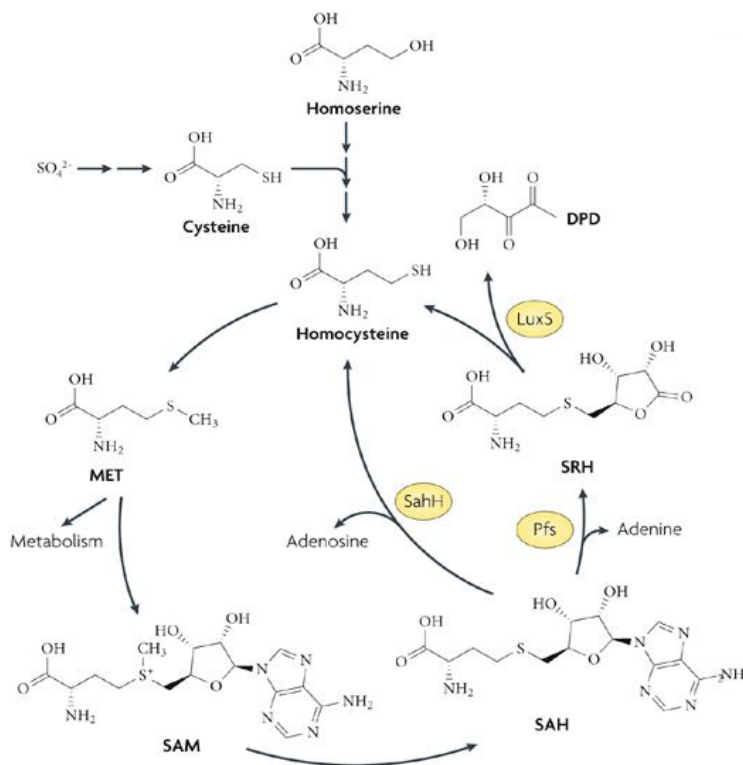
2.8. Escolha do modelo bacteriano de estudo

Como o estabelecimento desta simbiose deverá ser muito complexa devido às possíveis interações entre bactérias da mesma espécie e de espécies diferentes que podem ocorrer num ambiente de tão grande diversidade, o estudo da possível influência de mecanismos de detecção de quórum deve ser levado a cabo numa espécie bacteriana bem caracterizada. Assim, ela tem de reunir três características: (1) ser capaz de desenvolver uma colonização estável no ambiente intestinal de mamíferos, (2) poder ser alvo de manipulação genética, e (3) possuir um sistema de detecção de quórum que esteja bem descrito e que regule a expressão de genes presumivelmente importantes para a colonização. As bactérias da espécie *E. coli* são um dos poucos organismos que reúnem estas três características, e a regulação do seu sistema de detecção de quórum via AI-2 já foi estudada em algum detalhe (Xavier e Bassler, 2005a; Xavier e Bassler, 2007) e relacionada com a síntese de biofilmes (Barrios *et al.*, 2006; Herzberg *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), que poderão ser importantes na adesão das bactérias à mucosa intestinal e, conseqüentemente, no processo de colonização.

2.9. A detecção de quórum via AI-2

2.9.1. Síntese do sinal AI-2

Só é possível compreender o significado biológico e a importância da sinalização via AI-2 após conhecer os processos metabólicos que estão associados à sua síntese. O sinal designado AI-2 faz parte de um ciclo (esquematizado na FIGURA 3) necessário para a geração de moléculas de S-adenosilmetionina (SAM) que têm o potencial de transferir grupos metilo para RNA, DNA, alguns metabolitos e proteínas. Após esta transferência, forma-se o produto tóxico S-adenosilhomocisteína (SAH), que é necessário remover (Vendeville *et al.*, 2005). Diferentes organismos evoluíram no



LEGENDA | **DPD:** 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona; **MET:** metionina; **SAH:** S-adenosilhomocisteína; **SAM:** S-adenosilmetionina; **SahH:** S-adenosilhomocisteína hidrolase; **SRH:** S-ribosilhomocisteína

FIGURA 3 | O ciclo de grupos metilo ativados. Este ciclo tem como função gerar metabolitos SAM que possam transferir grupos metilo para outras moléculas. Esta transferência gera moléculas tóxicas de SAH que são detoxificadas por um de dois processos. Em alguns organismos, a enzima SAHh converte diretamente SAH em adenosina e homocisteína, molécula que pode ser convertida em metionina para fins metabólicos ou para repor a concentração de SAM. Os organismos que não possuem SAHh, sintetizam a enzima Pfs que converte SAH em SRH, o que é suficiente para anular a toxicidade de SAH (Xavier e Bassler, 2003). Para além de Pfs, a enzima LuxS também é sintetizada, clivando SRH e gerando homocisteína e a molécula precursora de AI-2 DPD. A concentração de homocisteína e metionina pode ser repostada a partir da conversão de cisteína e homoserina (adaptado de Hardie e Heurlier, 2008).

sentido de detoxificar as moléculas de SAH por dois mecanismos diferentes. No caso de eucariontes, arqueobactérias e algumas eubactérias, a presença da enzima SAH hidrolase desempenha o papel detoxificador. As eubactérias que não sintetizam esta enzima produzem duas outras, denominadas Pfs e LuxS, para desempenhar esta função. As moléculas de SAH são convertidas pela enzima Pfs em moléculas de S-ribosilhomocisteína (SRH) por depurinação, e a enzima LuxS cliva SRH produzindo homocisteína e moléculas de cinco carbonos denominadas 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD). Estas moléculas são precursoras do sinal AI-2 (Xavier e Bassler, 2003).

2.9.2. Estrutura do sinal AI-2

A análise da estrutura das moléculas de DPD mostrou que estas podem, espontaneamente, dar origem a diferentes moléculas de cadeia cíclica, como se pode ver na FIGURA 4. Estes compostos encontram-se em equilíbrio entre si, e o termo AI-2 é uma designação que abrange todas estas formas (Vendeville *et al.*, 2005). Estas

moléculas têm uma estrutura muito diferente dos autoindutores AHL característicos da comunicação entre bactérias Gram-negativas, apesar do metabolito SAM ser necessário para a síntese de ambos (Xavier e Bassler, 2003).

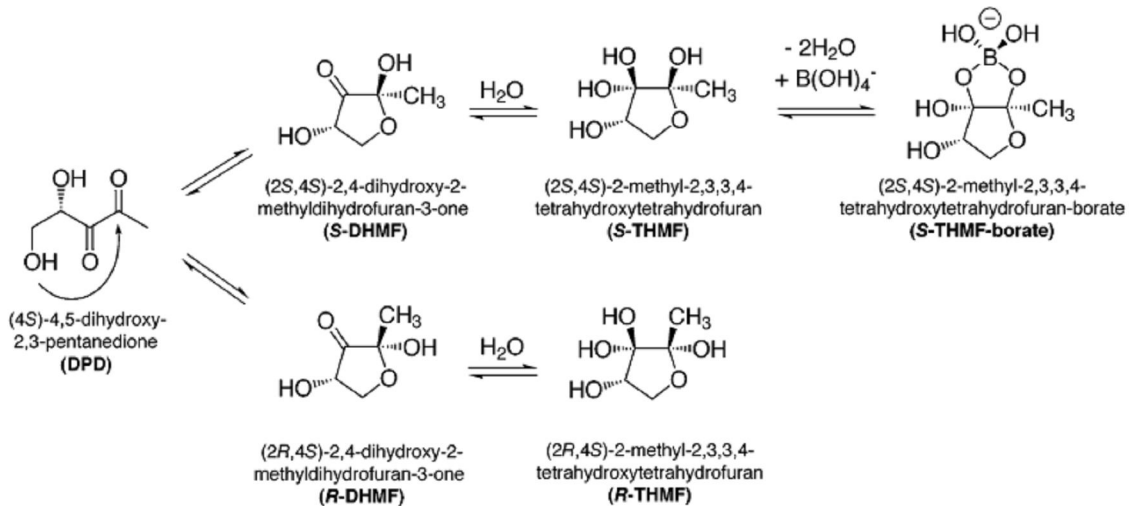


FIGURA 4 | Diversidade estrutural do sinal AI-2. As moléculas de DPD em solução convertem-se espontaneamente em moléculas de cadeia cíclica, e estas várias formas encontram-se em equilíbrio entre si (Miller *et al.*, 2004).

A existência de diferenças estruturais entre as várias formas de DPD implica que o mesmo sinal AI-2 poderá, teoricamente, ser reconhecido por receptores diferentes. De facto, já foram encontradas duas proteínas que conseguem interagir com duas formas distintas do sinal AI-2 (Vendeville *et al.*, 2005). Recorrendo à cristalografia de raios-X foi possível determinar a estrutura tridimensional da proteína LuxP, que é sintetizada por bactérias da espécie *Vibrio harveyi*, e a estrutura do seu ligando, que neste caso corresponde à forma S-THMF complexada com boro (ver FIGURA 4) do sinal AI-2 (Chen *et al.*, 2002). A proteína LsrB de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, por outro lado, reconhece a forma R-THMF (ver FIGURA 4) do sinal AI-2 (Miller *et al.*, 2004). Embora as proteínas LuxP e LsrB reconheçam diferentes formas do mesmo sinal, as semelhanças entre as sequências dos genes que as codificam são de apenas 11% (Miller *et al.*, 2004).

2.9.3. Comunicação interespecífica e distribuição do gene *luxS*

O resultado mais interessante do estudo de Miller *et al.* (2004) é talvez aquele em que se mostra que o sinal AI-2 produzido por *V. harveyi* pode ser reconhecido por *S. enterica* serotipo Typhimurium, e vice-versa. Devido à especificidade de

reconhecimento das proteínas LuxP e LsrB, este resultado só pode ser explicado pelo facto de, em solução, qualquer uma destas formas estruturais do sinal AI-2 se interconverter espontaneamente nas outras. Acima de mais, o que este resultado significa é que, ao contrário da detecção de quórum por meio de AHL, utilizada sobretudo em processos de comunicação intraespecífica (Waters e Bassler, 2005), a detecção de quórum via AI-2 permite que diferentes espécies de bactérias comuniquem entre si. A favorecer esta hipótese está o resultado de que a enzima LuxS é sintetizada em cerca de 40% das espécies de bactérias que têm o genoma sequenciado (Pereira *et al.*, 2008), e alguns exemplos podem ser observados no QUADRO 1. Esta é a única enzima conhecida até à data responsável pela produção de um sinal de detecção de quórum que é sintetizada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Vendeville *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que várias destas espécies produzem uma forma activa do sinal AI-2, e que esta molécula regula a expressão de genes muito diferentes, à semelhança do que acontece no caso de mecanismos de detecção de quórum via AHL: genes envolvidos na síntese de biofilmes, produção de factores de virulência, produção de luz, expressão de transportadores de membrana, etc. (Vendeville *et al.*, 2005).

QUADRO 1 | Algumas espécies bacterianas que possuem o gene *luxS*.

A lista abaixo indicada refere exemplos de bactérias cujo genoma foi sequenciado e que possuem genes homólogos ao gene *luxS* de *Vibrio harveyi* (Federle e Bassler, 2003)

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Vibrio parahemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Yersinia pestis</i>

2.9.4. Regulação gênica via AI-2: o operão *lsr* de *E. coli*

Apesar de estarem descritos vários comportamentos que são regulados pela presença de AI-2 em diferentes espécies de bactérias, os sistemas moleculares de detecção e transdução deste sinal só foram descritos em duas espécies do gênero *Vibrio* e para as espécies *S. typhimurium*, *E. coli* e *Sinorhizobium meliloti* (Bassler *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 2002; Taga *et al.*, 2003; Xavier e Bassler, 2005a; Xavier e Bassler, 2007; Pereira *et al.*, 2008). Em *E. coli*, as moléculas de AI-2 sintetizadas são segregadas para o meio, e a sua concentração extracelular aumenta à medida que as bactérias se multiplicam, tal como o que se verifica para qualquer outro sinal associado a processos de detecção de quórum. Contudo, ao contrário do que acontece com a maior parte das espécies que produzem AI-2, as bactérias da espécie *E. coli* internalizam o sinal existente no meio no final da fase exponencial de crescimento (Xavier e Bassler, 2005a). O mecanismo molecular subjacente a este comportamento consiste na indução do operão *lsr* (do inglês *luxS-regulated*). As bactérias da espécie *E. coli* produzem uma proteína, LsrK, que promove a fosforilação de AI-2, e esta forma fosforilada interage com o repressor LsrR, inibindo-o. Este acontecimento permite a expressão dos genes *lsrACDB* que codificam um transportador de membrana que importa AI-2, o que leva ao desaparecimento quase total do sinal no meio extracelular antes do início da fase estacionária de crescimento. Para além disso, os genes *lsrF* e *lsrG* também são expressos. As proteínas LsrF e LsrG estão envolvidas no processamento da forma fosforilada do sinal AI-2, e levam progressivamente à terminação da transcrição do operão *lsr* (Xavier *et al.*, 2007). A FIGURA 5 esquematiza a regulação do operão *lsr*.

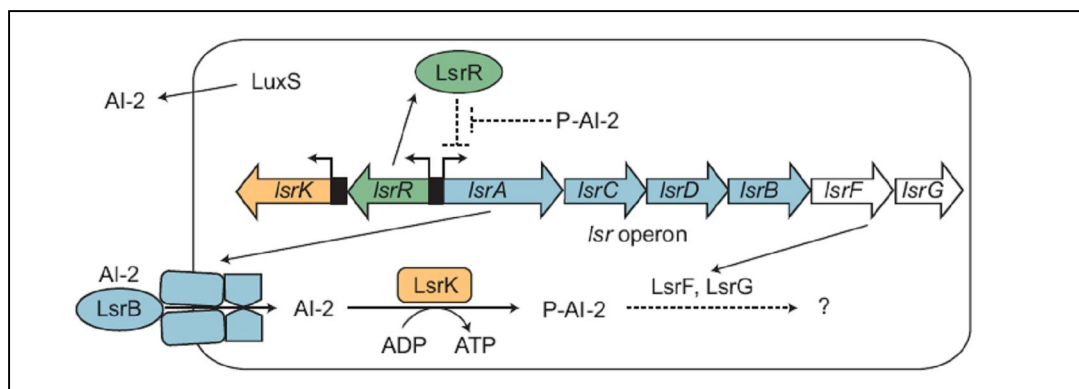


FIGURA 5 | O operão *lsr* de *E. coli*. A enzima LuxS sintetiza o sinal AI-2, que é segregado para o meio por um transportador desconhecido. A cinase LsrK fosforila as moléculas de AI-2, e é esta forma fosforilada que, ao interagir com o repressor LsrR, permite a expressão do operão *lsr*. Em consequência, os transportadores LsrACDB são expressos e o AI-2 do meio é internalizado. Juntamente com as componentes dos transportadores, são expressos os genes *lsrF* e *lsrG*, que processam a forma fosforilada do sinal AI-2 e levam à terminação da transcrição do operão *lsr* (adaptado de Xavier *et al.*, 2007).

2.9.5. Funções biológicas da sinalização via AI-2 em *E. coli*

A internalização do sinal envolvido no processo de detecção de quórum é um comportamento que sugere uma função biológica evidente. Uma vez que várias espécies de bactérias regulam a expressão de genes importantes para a colonização de habitats produzindo e detectando AI-2, bactérias que possuam mecanismos que interfiram com esta sinalização impedindo-a podem apresentar uma vantagem adaptativa na competição pelo mesmo habitat. De facto, Xavier e Bassler (2005b) demonstraram que quando a espécie patogénica *Vibrio cholerae* partilha o mesmo meio com uma estirpe não patogénica de *E. coli*, a presença de transportadores que internalizam o AI-2 produzido tanto por *E. coli* como por *V. cholerae* impede a indução de genes regulados por este sinal em *V. cholerae*. Serão necessários, contudo, estudos de co-colonização *in vivo* para demonstrar que este fenómeno de interferência tem relevância no ambiente intestinal do hospedeiro.

Outros estudos têm demonstrado que a detecção de AI-2 também influencia a síntese de biofilmes e a sua arquitectura (Barrios *et al.*, 2006; Herzberg *et al.*, 2006). Como alguns trabalhos já mostraram, o factor determinante para a formação de um ambiente altamente estruturado parece ser a presença de uma superfície que possibilite a formação de biofilmes, e não a existência de gradientes nutritivos e de pH (Sonnenburg *et al.*, 2004). Neste contexto, a capacidade para regular a síntese concertada de uma matriz que sirva de suporte a um biofilme através da detecção de AI-2 pode ter sido seleccionada ao longo da evolução porque esta estrutura poderá ser importante para a colonização do ambiente intestinal. Para compreender os aspectos que envolvem a colonização é necessário conhecer as características do meio onde esta se desenvolve.

3. O ecossistema bacteriano do intestino de mamíferos

3.1. Evolução, desenvolvimento e fisiologia do intestino

Desde o aparecimento dos primeiros animais multicelulares que se estabeleceram pressões evolutivas favorecendo a evolução de seres que apresentavam cavidades especializadas na digestão de compostos e absorção de nutrientes. Ao longo da evolução, os grupos celulares que desempenhavam estas funções sofreram uma

grande especialização, e o sistema gastrointestinal de mamíferos é exemplo dessa especialização (Stainier, 2005).

O desenvolvimento do intestino de mamíferos é extremamente complexo, e a maior parte da informação que foi reunida está relacionada com a formação de núcleos de células estaminais e com a morfogênese do tecido epitelial do intestino delgado de ratinhos. Nesta zona do intestino, uma especialização celular progressiva leva à diferenciação de invaginações, onde se vão localizar as células estaminais, e evaginações que vão dar origem a vilosidades (Crosnier *et al.*, 2006). Estas estruturas contribuem para que o intestino tenha uma área de superfície muito extensa, o que lhe permite estar bem adaptado para a absorção da maior parte dos nutrientes que foram previamente digeridos (Sherwood, 2007).

O intestino delgado desemboca no intestino grosso, a região terminal do sistema digestivo. A superfície deste órgão não possui vilosidades, e a sua função restringe-se sobretudo à absorção de água e sais minerais. Algumas das células do epitélio sintetizam e segregam um muco que contém vários tipos de nutrientes. Este muco facilita a passagem das fezes ao permitir a lubrificação da superfície luminal (Conway *et al.*, 2004; Sherwood, 2007).

3.2. Colonização do ambiente intestinal

Apesar do intestino grosso não segregar enzimas digestivas, alguns processos digestivos ainda ocorrem neste órgão. Na verdade, estes processos são desempenhados por bactérias, e o interior deste órgão serve como habitat a cerca de 10^{11} bactérias por grama de conteúdo intestinal (Whitman *et al.*, 1998), a mais alta densidade microbiana registada para um habitat (Ley *et al.*, 2006). Contudo, os mamíferos nascem sem microrganismos associados aos seus órgãos, e é após o nascimento que as superfícies e cavidades corporais são colonizadas. No caso do intestino, as primeiras bactérias a colonizá-lo pertencem às espécies que se encontram no ambiente vaginal materno. Em recém-nascidos, predominam as espécies *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp. e *Bifidobacterium* spp. (Falk *et al.*, 1998). Curiosamente, à excepção de *Bacteroides* spp., todas elas possuem o gene *luxS* (Vendeville *et al.*, 2005), o que talvez indique que a capacidade de produzir AI-2 seja de alguma forma importante para a estruturação da comunidade bacteriana residente no intestino.

3.3. Características do microbioma adulto

Uma característica importante das comunidades de bactérias intestinais é o dinamismo da sua estrutura. Vários factores influenciam a composição destas comunidades ao longo do desenvolvimento dos hospedeiros, como o tipo de dieta ou as características genéticas do hospedeiro. No caso específico dos mamíferos, as transições entre o período de lactação e a ingestão de alimentos sólidos deverão ser importantes na modelação das comunidades intestinais (Dethlefsen *et al.*, 2006).

O desenvolvimento e a aplicação de técnicas metagenómicas de análise molecular das comunidades intestinais levaram à descoberta de espécies bacterianas e relações filogenéticas anteriormente desconhecidas. Na verdade, a maior parte das espécies que habitam os intestinos de adultos pertencem a apenas dois dos 50 filos bacterianos conhecidos: *Firmicutes* ou *Bacteroidetes* (Eckburg *et al.*, 2005; Dethlefsen *et al.*, 2006). Neste contexto, a representatividade de *E. coli* (que está taxonomicamente agrupada no filo *Proteobacteria*) é muito baixa, uma vez que mais de 99% das espécies que habitam o intestino de adultos são anaeróbias obrigatórias, ao contrário do que acontece com *E. coli*. Para além deste facto, é também de referir que a subabundância de grupos taxonómicos mais inclusivos contrasta com a superabundância dos grupos taxonómicos menos inclusivos, ao nível da espécie e subespécie (Eckburg *et al.*, 2005).

3.4. Interações micróbio-hospedeiro

O hospedeiro não tem um papel passivo durante o processo de colonização, sobretudo em mamíferos. Nestes animais, a presença de um sistema imunitário muito especializado permite a detecção de padrões moleculares presentes em bactérias da microflora intestinal, e já foi demonstrado que esse reconhecimento é essencial para a manutenção da homeostasia do intestino grosso (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). No entanto, o epitélio do intestino grosso não possui células de Paneth, um tipo celular especializado na produção de agentes antimicrobianos que está presente no epitélio do intestino delgado (Falk *et al.*, 1998). Por outro lado, as espécies bacterianas também influenciam a fisiologia do próprio intestino, aumentando a reposição de células epiteliais e muco (Falk *et al.*, 1998), e estimulando o crescimento das vilosidades e a formação de capilares a elas associados (Stappenbeck *et al.*, 2002). Além disso, a microflora induz o desenvolvimento de vários tecidos linfóides e a maturação do sistema imunitário do hospedeiro (Round e Mazmanian, 2009).

3.5. Evolução do desenvolvimento simbiótico

A existência de uma simbiose tão íntima, onde microflora e hospedeiro se influenciam mutuamente, só foi provavelmente possível porque ambos co-evoluíram numa situação de grande proximidade durante milhares de anos. Na verdade, o ambiente intestinal é rico em materiais não digeridos que podem ser metabolizados pela microflora; por outro lado, também existem benefícios para o hospedeiro: as bactérias promovem o desenvolvimento e a maturação do sistema imunitário, e já foi demonstrado o seu papel na protecção contra a colonização intestinal de bactérias patogénicas. Em última análise, esta simbiose revela essencialmente um carácter mutualista, já que ambas as espécies derivam benefícios desta associação (Round e Mazmanian, 2009). Um número cada vez maior de estudos põe em evidência que o desenvolvimento de comunidades microbianas no intestino é um processo fundamental que pode ser considerado como parte integrante do desenvolvimento do próprio hospedeiro. Processos como estes terão muito provavelmente uma regulação muito fina para garantirem uma situação de equilíbrio simbiótico. Neste contexto, os sistemas de detecção de quórum podem desempenhar um papel importante, já que regulam os padrões de expressão bacteriana em transições de baixa para alta densidade celular, o mesmo tipo de transições que ocorrem durante a colonização do ambiente intestinal de mamíferos.

Materiais e métodos

Estirpes utilizadas

A lista completa das estirpes utilizadas no presente trabalho de investigação, os seus genótipos relevantes, e o modo como foram construídas, estão sintetizados no QUADRO 2 (os protocolos utilizados na construção das estirpes referidas encontram-se em anexo). As estirpes construídas foram armazenadas seguindo o procedimento do PROTOCOLO 1.

QUADRO 2 | Estirpes de *E. coli* utilizadas no presente trabalho de investigação.

Estirpe	Genótipo relevante	Estirpe parental	Construção
MG1655	estirpe selvagem	-	-
MC4100-YFP	YFP str ^R	MC4100	Hegreness <i>et al.</i> , 2006
MC4100-CFP	CFP str ^R	MC4100	Hegreness <i>et al.</i> , 2006
KX1086	pKD20 temp ^S amp ^R	MG1655	electroporação de pKD20
pKD3	pKD3 cm ^R amp ^R	MG1655	electroporação de pKD3
DM002	$\Delta lacIZYA::cm^R$	KX1086	este estudo
DM003	$\Delta lacIZYA::cm^R$	MG1655	este estudo
DM004	$\Delta lacIZYA::cm^R$ YFP::amp ^R	DM003	este estudo
DM005	$\Delta lacIZYA::cm^R$ CFP::amp ^R	DM003	este estudo
DM006	$\Delta lacIZYA::cm^R$ YFP::amp ^R str ^R	DM004	este estudo
DM007	$\Delta lacIZYA::cm^R$ CFP::amp ^R str ^R	DM005	este estudo
pcp20	pCP20 cm ^R amp ^R	BT340	Datsenko e Wanner, 2000
KX1102	$\Delta lacZYA::cm^R$	MG1655	Xavier e Bassler, 2005a
NO11	$\Delta lacIZYA$	DM003	ver PROTOCOLO 3
NO21	$\Delta lacIZYA$ YFP::amp ^R	NO11	ver PROTOCOLO 5
NO23	$\Delta lacIZYA$ CFP::amp ^R	NO11	ver PROTOCOLO 5
DM008	$\Delta lacIZYA$ YFP::amp ^R str ^R	NO21	este estudo
DM009	$\Delta lacIZYA$ CFP::amp ^R str ^R	NO23	este estudo
KX1201	$\Delta luxS$	MG1655	Datsenko e Wanner, 2000
NO13	$\Delta luxS \Delta lacIZYA::cm^R$	KX1201	ver PROTOCOLO 5
NO15	$\Delta luxS \Delta lacIZYA$	NO13	ver PROTOCOLO 5
NO25	$\Delta luxS \Delta lacIZYA$ YFP::amp ^R	NO15	ver PROTOCOLO 5
NO27	$\Delta luxS \Delta lacIZYA$ CFP::amp ^R	NO15	ver PROTOCOLO 5
DM010	$\Delta luxS \Delta lacIZYA$ YFP:: amp ^R str ^R	NO25	este estudo
DM011	$\Delta luxS \Delta lacIZYA$ CFP:: amp ^R str ^R	NO27	este estudo

Legenda | amp^R: gene de resistência a ampicilina; cm^R: gene de resistência a cloranfenicol; str^R: gene de resistência a estreptomicina; temp^S: origem de replicação termossensível

Delecção dos genes *lacIZYA*

A delecção dos genes *lacIZYA* da estirpe MG1655 de *E. coli* foi realizada em dois passos. O primeiro consistiu na delecção dos genes *lacIZYA* da estirpe KX1086 segundo o método desenvolvido por Datsenko e Wanner (2000), cujo protocolo se encontra em anexo (PROTOCOLO 2). Para este fim, foram desenhados iniciadores de PCR (Sigma) recorrendo ao programa *Vector NTI Advance* 11.0 (Invitrogen), com as sequências 5'-CCTTTGCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' (iniciador directo) e 5'-GCTGAACTGTAGGCCTGATAAGCGCAGCGTATCAGGCAATTTTTATAATCATATGAATATCCTCCTTAGT - 3' (iniciador reverso). Estes iniciadores contêm regiões homólogas a sequências a montante do gene *lacI* e a jusante do gene *lacA* de 50 nucleótidos na extremidade 5', e uma região iniciadora da reacção de PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) de 20 nucleótidos na extremidade 3' que é complementar às extremidades do gene de resistência a cloranfenicol da estirpe pKD3 que foi utilizado como gene marcador. Os plasmídeos pKD3 foram extraídos de bactérias da estirpe pKD3 por meio do kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN). Os fragmentos amplificados foram purificados através do kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN). Após a incubação dos genes de resistência a cloranfenicol obtidos por PCR com DpnI, procedeu-se a um passo adicional de purificação com o kit anterior. Depois de juntar as amostras, elas foram concentradas no aparelho *SpeedVac* (GMI) e a quantidade de ácidos nucleicos foi determinada pelo aparelho *Nanodrop* (Thermo Scientific) por recurso ao programa *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* 3.7.1. A electroporação foi levada a cabo no aparelho *MicroPulser* (BioRad). O plasmídeo pKD20 foi perdido após realizadas duas passagens nas condições mencionadas (ver PROTOCOLO 2). A confirmação da delecção foi realizada segundo o procedimento descrito no PROTOCOLO 2, e por comparação com as estirpes KX1102 e MG1655 de *E. coli*.

Excisão do gene de resistência a cloranfenicol

A excisão do gene de resistência a cloranfenicol inserido foi realizada segundo o PROTOCOLO 3 (ver em anexo). O plasmídeo pCP20 utilizado foi extraído da estirpe pcp20 através do kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN). Esta excisão foi levada a cabo na estirpe DM003.

Preparação de lisados com bacteriófagos P1

A preparação de lisados com bacteriófagos P1 para utilizar em experiências de transdução foi realizada segundo o PROTOCOLO 4 (ver em anexo). Um lisado de reserva contendo bacteriófagos P1 gerados a partir de infecção em *E. coli* MG1655 foi utilizado para infectar a estirpe DM002, tendo-se recolhido e armazenado o lisado resultante. O lisado de reserva inicial também foi utilizado para infectar as estirpes MC4100-YFP e MC4100-CFP, recolhendo-se e armazenando-se o lisado resultante.

Inserção de genes por transdução com o bacteriófago P1

A inserção de genes no genoma de várias estirpes de *E. coli* realizada por transdução com o bacteriófago P1 seguiu os passos do PROTOCOLO 5 (ver em anexo). A cassete de resistência ao antibiótico cloranfenicol que resultou da deleção dos genes *lacIZYA* foi inserida na estirpe MG1655 de *E. coli* por infecção com o lisado fágico de DM002. O gene que codifica a proteína YFP foi inserido na estirpe DM003 por infecção com o lisado fágico de MC4100-YFP. O gene que codifica a proteína CFP foi inserido na estirpe DM003 por infecção com o lisado fágico de MC4100-CFP. O gene *rpsL*, que confere resistência à estreptomicina, foi inserido no genoma das estirpes DM004 e DM005 por infecção com o lisado fágico de MC4100-YFP.

Visualização de estirpes fluorescentes

As estirpes fluorescentes foram inoculadas em placas de Petri com meio LB de modo a obter colónias individualizadas. Após uma incubação de cerca de 16h a 37°C, e sem agitação, cada placa foi visualizada numa lupa binocular *SteroLumar* (Zeiss). Utilizando uma câmara CCD acoplada ao aparelho, e o programa *AxioVisionFret* 4.6.3.0, foram adquiridas imagens das colónias obtidas para cada estirpe utilizando luz branca (tempo de exposição: 5 ms), um filtro para detecção de fluorescência emitida por GFP e um filtro para detecção de fluorescência emitida por YFP (em ambos os casos o tempo de exposição foi de 180 ms).

Experiências de inoculação de ratinhos

A preparação dos inóculos a administrar aos ratinhos foi feita da mesma maneira para as três experiências de colonização (Experiência 1: inoculação da estirpe DM006; Experiência 2: inoculação conjunta das estirpes DM006 e DM007; Experiência 3: inoculação conjunta de várias combinações das estirpes DM008, DM009, DM010 e

DM011). As estirpes a inocular foram crescidas previamente em 5mL de meio BHI durante cerca de 16h de incubação a 37°C, com agitação. Após esta incubação inicial, cada amostra foi diluída 1:100 em 100mL de meio BHI e incubada entre 2h30 a 3h nas mesmas condições, até que a densidade óptica da suspensão celular fosse superior a 2. Em seguida, as suspensões celulares foram transferidas para dois tubos de 50mL e centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e o sedimento foi homogeneizado em 1mL de PBS. As bactérias presentes nesta amostra de elevada densidade celular foram diluídas para quantificação utilizando um citómetro de fluxo, de acordo com o procedimento indicado mais à frente. Depois de quantificadas, as amostras foram diluídas em PBS para obter a densidade celular pretendida para o inóculo. As bactérias foram inoculadas em ratinhos da estirpe C57Bl/6 pelo método de gavagem.

Para a Experiência 1, dez ratinhos com nove semanas de vida, e mantidos em condições convencionais com comida esterilizada e água *ad libitum*, foram repartidos por duas caixas. Cada caixa continha um grupo de cinco ratinhos. Sulfato de estreptomicina (Sigma) foi adicionado à água dos ratinhos do grupo 2, de modo a perfazer uma concentração de 5g/L. Nove dias após o início do tratamento com estreptomicina, os ratinhos #3, #4 e #5 (grupo 1), #8, #9 e #10 (grupo 2) foram injectados com 50µL de PBS contendo cerca de 10^{10} bactérias da estirpe DM006. Para a Experiência 2, três ratinhos com cinco semanas de vida, e mantidos nas mesmas condições que os anteriores, foram transferidos para uma só caixa. Estes animais foram submetidos ao mesmo tratamento de estreptomicina. Três dias após o início deste tratamento, todos os ratinhos foram injectados com 100µL de PBS contendo uma mistura com $1,85 \cdot 10^8$ bactérias da estirpe DM006 e $1,77 \cdot 10^8$ bactérias da estirpe DM007 (total: $3,62 \cdot 10^8$ bactérias). Para a Experiência 3, vinte ratinhos com quatro semanas de vida, e mantidos nas mesmas condições que os anteriores, foram separados em quatro caixas. Cada caixa continha um grupo de cinco ratinhos. Estes animais foram submetidos ao mesmo tratamento de estreptomicina. Cinco dias após o início deste tratamento, os ratinhos foram injectados com 100µL de PBS contendo cerca de $2 \cdot 10^8$ bactérias. Os ratinhos foram inoculados com uma mistura 1:1 das estirpes: DM008 e DM009 (ratinhos #1 a #5, Grupo 1), DM010 e DM011 (ratinhos #6 a #10, Grupo 2), DM008 e DM011 (ratinhos #11 a #15, Grupo 3) ou DM009 e DM010 (ratinhos #16 a #20, Grupo 4).

Manutenção de ratinhos inoculados e recolha de fezes

Após inoculação, os ratinhos foram transferidos para a unidade do biotério de maior nível de segurança (Quarentena). Os animais foram mantidos em caixas com comida esterilizada e água *ad libitum* à temperatura de 22°C e a um nível de humidade relativa de 68%. As caixas e a água com estreptomicina foram substituídas todas as semanas, de acordo com a duração de cada experiência. Uma amostra de fezes foi recolhida directamente a partir de cada animal (como descreve Giraud *et al.* (2001), quando um ratinho é manipulado pelo experimentador um reflexo natural leva à excreção de fezes) nos dias pretendidos, e cada uma foi armazenada num eppendorf estéril e marcado. Esta operação foi realizada numa câmara de fluxo laminar. Os eppendorfs foram pesados numa balança de alta precisão antes e após a colheita de fezes, de modo a determinar o peso de cada amostra.

Processamento das amostras de fezes recolhidas

O procedimento abaixo indicado foi desenvolvido e aperfeiçoado para o processamento das fezes recolhidas. As fezes dos animais foram mantidas em gelo até serem processadas para impedir a proliferação das bactérias fecais. As amostras foram dissolvidas em caixas de Petri pela adição de 1mL de PBS, e esmagadas com a ajuda de duas pinças contra uma malha de plástico com um poro de 100µm de diâmetro. Após este tratamento inicial, e como ainda restavam muitas partículas sólidas, o líquido foi filtrado. Para tal, utilizaram-se colunas do *kit QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) às quais foi retirado o filtro original e colocada em seu lugar uma nova malha de plástico semelhante à usada no passo de dissolução das fezes. O volume de líquido foi colocado no topo da coluna e a abertura para o exterior selada. O tubo foi centrifugado durante 10 segundos, recolhendo-se o líquido filtrado e descartando os sedimentos. Devido à formação de um depósito no fundo do tubo colector, o conteúdo deste foi homogeneizado antes de se proceder às diluições em PBS necessárias.

Análise de bactérias por citometria de fluxo

A presença de bactérias intestinais foi detectada e a sua quantificação foi levada a cabo segundo dois métodos diferentes. A análise de bactérias por medição de fluorescência em citómetro de fluxo foi também uma técnica desenvolvida neste trabalho de investigação. Esta análise foi levada a cabo no citómetro *BD FACSAria* (Bacton Dickinson). A análise foi efectuada adicionando a um tubo de plástico 200µL

de formalina a 10%, 200µL de PBS, 5µL de uma solução diluída 1:2 em PBS de esferas de vidro com 2,04µm de diâmetro (SpheroTech) e 5µL de uma diluição 1:10 em PBS de uma suspensão de bactérias fecais proveniente dos ratinhos inoculados (no caso de outras amostras, foi utilizada a diluição mais apropriada). As estirpes DM006, DM007, DM008, DM009, DM010 e DM011 foram quantificadas através deste procedimento, recorrendo ao programa *FloJo* 8.8.4.

Análise de bactérias intestinais por inoculação em placa

Para a determinação do efeito do tratamento de estreptomicina na microflora de ratinhos, após o processamento das fezes foram plaqueados 100µL da amostra não diluída e 100µL da diluição 10^{-1} em meio LB. As placas foram incubadas a 37°C, sem agitação, durante cerca de 40h. Foram ainda plaqueados 100µL da amostra não diluída em meio LB com ampicilina e estreptomicina (meio selectivo). Estas placas foram incubadas nas condições já mencionadas, com excepção do tempo de incubação, que foi de aproximadamente 16h.

Nas análises em que foram comparados os métodos de quantificação por plaqueamento e por citometria de fluxo, as amostras de fezes colhidas foram plaqueadas de acordo com o que foi indicado para o plaqueamento em meio selectivo, mas, neste caso, foram preparadas e plaqueadas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} em PBS de todas as amostras. Os tubos que continham as diluições foram guardados no frigorífico e, no dia seguinte, após observar os resultados do plaqueamento, plaquearam-se cinco réplicas da diluição 10^{-4} para todas as amostras processadas.

Nas análises de bactérias intestinais relativas às experiências de inoculação, procedeu-se de acordo com o que foi indicado para o plaqueamento em meio selectivo, mas, neste caso, foram preparadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em PBS de todas as amostras e foram plaqueadas as diluições 10^{-3} e 10^{-4} (quatro réplicas cada).

Visualização de bactérias directamente nas fezes

Amostras de fezes directamente colhidas de ratinhos inoculados com a estirpe DM006 foram colocadas em placas de seis poços, de modo a que cada amostra ocupasse apenas um poço. Uma solução de agarose a 1% foi aquecida até ficar líquida e, após arrefecimento, vertida para dentro de cada poço de maneira a que a superfície das fezes oposta ao fundo da placa não fosse coberta pela agarose. Após solidificação da agarose, a fluorescência das amostras foi analisada através de um microscópio de fluorescência

multi-fotão *Prairie Ultima X-Y Laser Scanner*. Técnicas de microscopia confocal foram utilizadas para obter várias imagens de cada amostra. Estas imagens foram compiladas para reconstrução tridimensional das secções e processamento das imagens utilizando o programa *Imaris 6.3*.

Determinação da neutralidade dos marcadores fluorescentes

As estirpes DM008, DM009, DM010 e DM011 foram inoculadas em 5 mL de meio BHI e incubadas a 37°C, com agitação, durante cerca de 16h. Após a incubação, as densidades ópticas das amostras foram medidas a $\lambda = 600\text{nm}$ utilizando um espectrofotómetro. Quatro erlenmeyers contendo 50mL de meio BHI foram inoculados com 50 μL de uma mistura 1:1 contendo as estirpes DM008 e DM009, DM010 e DM011, DM008 e DM011 ou DM009 e DM010. Como as densidades ópticas das estirpes previamente incubadas não eram exactamente iguais, os volumes a inocular nos erlenmeyers foram corrigidos para que cada par de estirpes se encontrasse na proporção 1:1. Após a inoculação, os quatro erlenmeyers foram incubados a 37°C, com agitação, e foi retirado 1mL de cada suspensão celular em crescimento para contagem de células no início da incubação e 2h, 3h, 5h, 6h, 7h e 9h depois. Estas amostras foram contadas num citómetro de fluxo de acordo com o procedimento já mencionado.

Resultados e discussão

Escolha do modelo biológico utilizado nas experiências de inoculação

A espécie bacteriana *E. coli* foi escolhida como modelo biológico a utilizar nas experiências de colonização porque apresenta características muito importantes no contexto do estudo realizado. Antes de mais, esta é uma das espécies que colonizam o tracto gastrointestinal de mamíferos (Conway *et al.*, 2004), o que é uma condição essencial para que as experiências de colonização sejam bem sucedidas. Além disso, estas são as bactérias anaeróbias facultativas predominantes no ambiente intestinal de mamíferos (Conway *et al.*, 2004), o que indica que é possível que tenham sido seleccionadas ao longo da evolução por desempenharem funções importantes neste habitat. Para estudar a influência de um sistema de detecção de quórum no decurso da colonização intestinal foi escolhido o sistema biossensor de AI-2 porque vários estudos já associaram a detecção de AI-2 à formação de biofilmes (Barrios *et al.*, 2006; Herzberg *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), que serão provavelmente importantes para o estabelecimento de *E. coli* no intestino. Para além disso, a regulação génica deste sistema já foi estudada em algum detalhe e foram construídas várias estirpes mutantes que serão muito úteis no contexto da presente investigação (Xavier e Bassler, 2005a; Xavier e Bassler, 2007).

Uma das grandes vantagens em utilizar a espécie *E. coli* reside na quantidade de informação que existe acerca deste organismo. Na verdade, é considerado que esta é a espécie mais estudada e compreendida a nível genético (Conway *et al.*, 2004), o que torna mais fácil estabelecer as condições ideais para manipulá-la. Como o genoma da estirpe MG1655 de *E. coli* já foi sequenciado (Blattner *et al.*, 1997), esta é uma estirpe indicada para utilizar como modelo no contexto deste trabalho de investigação. Por outro lado, também era necessário marcar a espécie a inocular de modo a que a sua identificação fosse fácil e rápida. Como um dos objectivos deste trabalho era desenvolver uma técnica que permitisse uma contagem eficiente de bactérias provenientes das fezes, optou-se por marcar as estirpes através da inserção de genes que codificam proteínas fluorescentes. A utilização de um citómetro de fluxo permitiria a sua posterior identificação e contagem de uma forma rápida e eficiente. A inserção dos genes referidos não foi realizada pela introdução de um plasmídeo porque as bactérias que os possuem têm de ser mantidas num meio selectivo para que não percam estes

elementos génicos à medida que o número de gerações aumenta. Nas experiências de inoculação realizadas, a administração de um meio selectivo, usualmente composto por um antibiótico, juntamente com a estirpe inoculada, constituiria um factor adicional para a desestabilização da flora bacteriana, o que a distanciaria das condições convencionais em que se procurou manter os hospedeiros. Para superar esta limitação, optou-se por inserir os genes que codificam as proteínas fluorescentes no genoma das estirpes utilizadas.

Estratégia utilizada para construir estirpes colonizadoras

O ponto de partida para a construção das estirpes colonizadoras foram as estirpes MC4100-YFP e MC4100-CFP (Hegreness *et al.*, 2006). Estas estirpes derivam de *E. coli* MC4100, e não de *E. coli* MG1655. A estirpe MC4100 é uma estirpe MG1655 que sofreu várias modificações genómicas e que tem servido ao longo de vários anos como modelo biológico em muitas experiências de Biologia Molecular, sobretudo por motivos históricos. Ainda que seja muito utilizada, as modificações que ocorreram na estirpe MG1655 e que levaram à formação da estirpe MC4100 não são totalmente claras (Peters *et al.*, 2003). Assim, e de acordo com as vantagens já evidenciadas para a estirpe MG1655, optou-se por usar esta última como *background* genético no contexto das experiências de inoculação realizadas.

As estirpes a inocular devem expressar constitutivamente os genes que codificam as proteínas marcadoras, para que a sua detecção seja fácil. Como as estirpes MC4100-YFP e MC4100-CFP possuem, respectivamente, genes que codificam as proteínas YFP (do inglês *yellow fluorescent protein*) e CFP (do inglês *cyan fluorescent protein*) sob o controlo de um promotor regulado pelo repressor do operão da lactose, estes genes só serão expressos constitutivamente na ausência do gene que codifica o repressor LacI. Assim, e como a estirpe MG1655 foi escolhida para *background* genético, procedeu-se à deleção dos genes *lacIZYA* para que, uma vez inseridos os genes que codificam as proteínas YFP e CFP, estes pudessem ser expressos constitutivamente.

Deleção dos genes *lacIZYA*

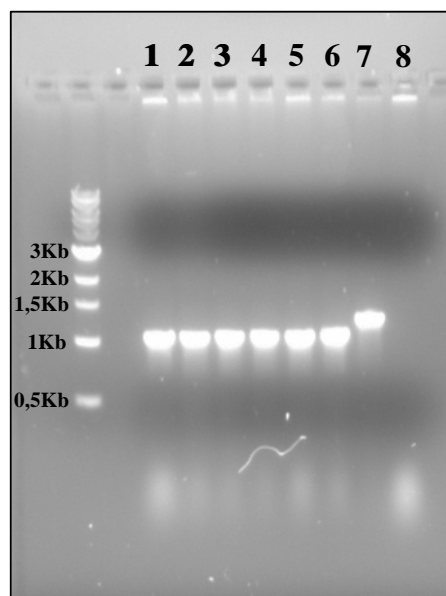
A deleção foi realizada segundo o método de Datsenko e Wanner (2000), um método simples para eliminar genes do cromossoma de bactérias da espécie *E. coli*. Uma vez realizada a deleção, este método também permite que as bactérias em que o

gene foi eliminado sejam seleccionadas, já que esse gene é substituído por outro que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol. Este método é ainda muito útil porque o gene marcador encontra-se marginado por sequências FRT (do inglês *flipase recognition target*), que possibilitam a sua excisão (Datsenko e Wanner, 2000).

Uma etapa crítica deste método consiste na adição de uma grande quantidade de fragmento contendo o gene marcador na cuvette de electroporação, de modo a maximizar o número de bactérias em que se dá o evento de recombinação que leva à deleção. De facto, foram obtidos vários clones recombinantes provavelmente porque a amostra que continha os fragmentos a inserir apresentava uma concentração de cerca de 257µg/µL, que pode ser considerada uma concentração elevada.

Alguns dos clones obtidos foram analisados para confirmar a existência da deleção mencionada. Como a FIGURA 6 mostra, os seis clones analisados (troços 1 a 6) apresentavam a deleção, uma vez que a sequência entre os genes delectados possui cerca de 1Kb, o que está de acordo com o tamanho que seria de esperar se a cassette de resistência a cloranfenicol utilizada, de 1,1Kb, fosse introduzida em substituição dos genes *lacIZYA*. Para além disso, compreende-se que o tamanho da região amplificada nos seis clones analisados seja, ainda que próximo, menor do que a região correspondente para a estirpe $\Delta lacZYA$, já que os clones obtidos, para além de não possuírem os genes *lacZYA*, também não possuem o gene *lacI*. A estirpe selvagem MG1655 foi ainda utilizada como controlo negativo (troço 8) na experiência de confirmação da deleção, apesar de não ser possível visualizar a banda correspondente (ver FIGURA 6). Este resultado pode dever-se às condições que foram utilizadas durante o passo de amplificação da reacção de PCR (ver PROTOCOLO 2 em anexo). Como a sequência *lacIZYA* tem cerca de 6 Kb, ela só poderia ser amplificada numa estirpe selvagem se o tempo de amplificação fosse maior do que os 1,5 minutos que foram utilizados para amplificar segmentos genéticos mais reduzidos.

FIGURA 6 | Verificação da deleção dos genes *lacIZYA* da estirpe KX1086. A sequência compreendida entre o início do gene *lacI* e o fim do gene *lacA* foi amplificada em algumas colónias obtidas através do método de Datsenko e Wanner (2000) para verificar se a deleção dos genes *lacIZYA* ocorrera. Os fragmentos resultantes (troços 1 a 6) foram submetidos a electroforese em gel de agarose. Procedeu-se da mesma forma para bactérias $\Delta lacZYA$ (estirpe KX1102, troço 7) e MG1655 (troço 8).



Excisão do gene de resistência a cloranfenicol

A deleção foi efectuada na estirpe KX1086 porque esta já continha o plasmídeo necessário à expressão da recombinase que induz a inserção do fragmento pretendido. Para excluir a possibilidade de que o *background* genético de KX1086 tivesse mais alguma mutação para além daquela que foi induzida, transferiu-se a deleção para uma estirpe selvagem MG1655 por transdução com bacteriófagos P1, sendo os transdutantes seleccionados por crescimento em meio com cloranfenicol. Após esta transferência, procedeu-se à excisão do gene de resistência inserido.

Vários estudos já demonstraram que a presença de genes que conferem resistência a antibióticos tem um custo na *fitness* do organismo que possui esses genes (Lenski, 1998). Assim, como este gene só foi importante para a selecção de clones recombinantes, e para não diminuir a *fitness* das estirpes a inocular de tal modo que a colonização do ambiente intestinal fosse dificultada, procedeu-se à excisão do referido gene. A ocorrência desta excisão foi confirmada pela ausência de crescimento das estirpes resultantes em meio com cloranfenicol, ainda que houvesse crescimento em meio sem antibióticos.

Construção de estirpes fluorescentes

O último passo para a construção de estirpes que expressem constitutivamente YFP ou CFP passa pela introdução dos genes que as codificam no genoma da estirpe que possui uma deleção dos genes *lacIZYA*. Uma técnica simples, rápida e eficiente para transferir genes entre estirpes de *E. coli* é a técnica de transdução por meio de bacteriófagos P1. Assim, infectaram-se as estirpes-alvo com bacteriófagos P1 obtidos por crescimento na estirpe dadora e, como o gene que codifica as proteínas referidas se encontra próximo de um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, utilizou-se um meio selectivo contendo este antibiótico para seleccionar bactérias transdutantes.

Visualização das estirpes fluorescentes construídas

Uma vez construídas as estirpes pretendidas, procurou-se avaliar se estas expressavam o gene que codifica a proteína fluorescente inserida, e se a fluorescência emitida era suficientemente intensa para ser detectada. Assim, foram observadas colónias individualizadas de *E. coli* $\Delta lacIZYA$ YFP::amp^R (estirpe NO21) e de *E. coli* $\Delta lacIZYA$ CFP::amp^R (estirpe NO23) recorrendo a uma lupa binocular (ver FIGURA 7).

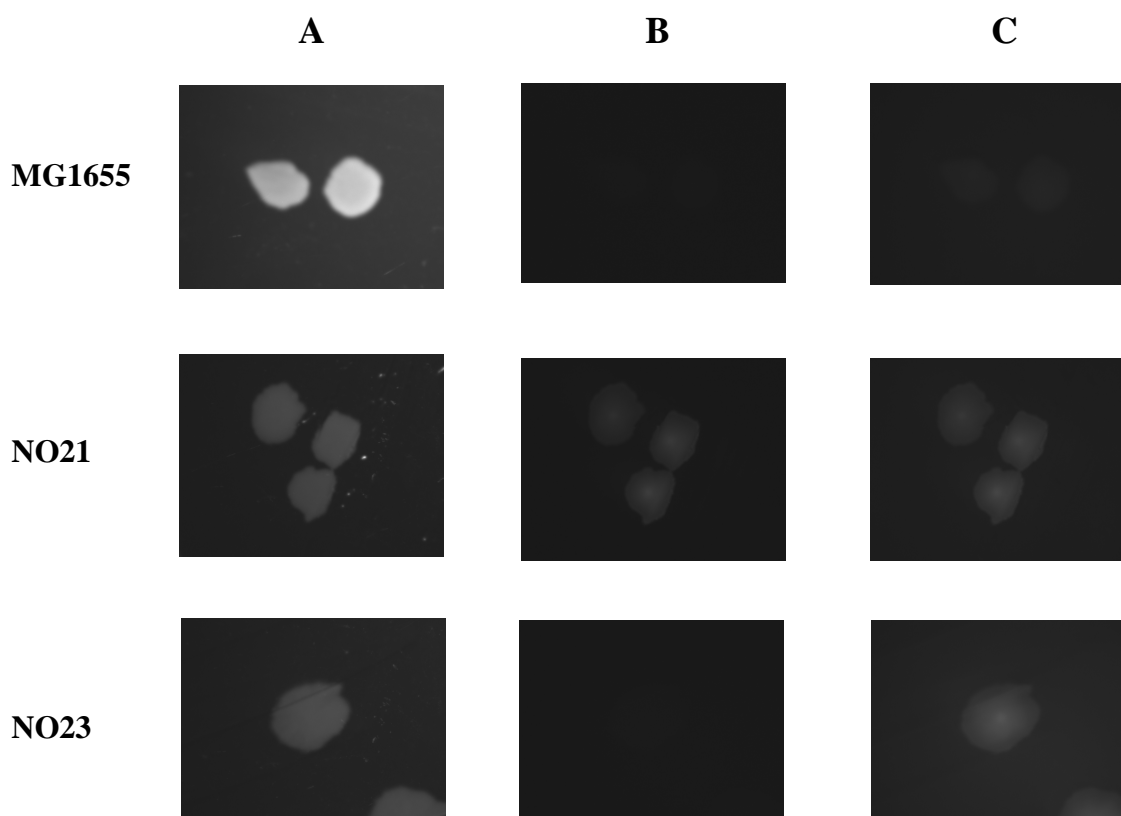


FIGURA 7 | Visualização das estirpes fluorescentes construídas. Após plaqueamento das estirpes YFP⁺ (NO21) e CFP⁺ (NO23) construídas, as colónias obtidas foram analisadas à lupa binocular. As imagens representam fotografias captadas utilizando diferentes tipos de luz incidente: luz branca (A), luz com comprimentos de onda ideais para excitar YFP (B) e luz com comprimentos de onda ideais para excitar GFP (C). Colónias da estirpe MG1655 também foram analisadas nestas três condições para comparação com colónias das estirpes NO21 e NO23.

Como a FIGURA 7 mostra, ao contrário das bactérias da estirpe MG1655, ambas as estirpes YFP⁺ (NO21) e CFP⁺ (NO23) apresentam níveis de fluorescência detectáveis à lupa binocular. A identificação das bactérias que sintetizam YFP pode ser feita directamente devido à existência de um filtro apropriado. Porém, para além deste filtro, a lupa binocular utilizada só tem mais um filtro, e ele está optimizado para a visualização de GFP (do inglês *green fluorescent protein*). Ainda assim, é possível notar que alguma da radiação emitida através do filtro para visualização de GFP pode excitar CFP (ver FIGURA 7, NO23-C), o que se traduz num sinal de fluorescência para CFP que, apesar de ser menos intenso do que aquele que é emitido pela estirpe YFP, consegue ainda ser detectado. Este sinal é devido à presença da proteína fluorescente porque a estirpe selvagem MG1655 não apresenta autofluorescência (ver FIGURA 7, MG1655-B,C). Apesar de também haver excitação de YFP quando o filtro para visualização de GFP está a ser utilizado (ver FIGURA 7, NO21-C), é de notar que este facto não

impossibilita a detecção de bactérias produtoras de YFP ou CFP mesmo que estas se encontrem próximas, uma vez que o número de colónias produtoras de CFP pode ser obtido se ao total de colónias fluorescentes observadas com o filtro GFP for subtraído o número de colónias observadas com o filtro YFP.

Escolha do modelo biológico utilizado como hospedeiro

Para inocular as estirpes de *E. coli* que foram construídas optou-se por escolher como hospedeiros ratinhos da espécie *Mus musculus* estirpe C57Bl/6. Estes organismos são um dos modelos de mamíferos mais utilizados em investigação, uma vez que a sua manutenção, reprodução e manipulação num contexto laboratorial são fáceis. No contexto do presente trabalho, este modelo é particularmente útil porque a biologia do desenvolvimento intestinal encontra-se bem estudada a nível molecular, celular e fisiológico (Falk *et al.*, 1998; Crosnier *et al.*, 2006), e porque já se conhecem várias características do seu microbioma (Falk *et al.*, 1998; Ley *et al.*, 2006), condições essenciais para uma compreensão mais completa dos efeitos causados pela manipulação do microbioma intestinal. Para além disso, esta espécie tem ainda a vantagem de ter muitas semelhanças com o sistema gastrointestinal humano e com o número de espécies bacterianas e sua abundância relativa no contexto do microbioma intestinal (Ley *et al.*, 2006), o que faz com que este organismo possa ser um dos melhores modelos a utilizar em estudos futuros para o desenvolvimento de fármacos que tenham uma acção sobre as bactérias presentes no intestino de humanos.

A estirpe C57Bl/6 foi escolhida porque é uma estirpe isogénica, o que assegura uma maior reprodutibilidade dos resultados obtidos, e porque ela se encontra acessível através de um dos serviços proporcionados pelo biotério do instituto onde o trabalho de investigação foi realizado.

Escolha do modelo de ratinho a utilizar

Existem três tipos de modelos animais para experiências de colonização intestinal: o modelo convencional, o modelo isento de micróbios e o modelo tratado com estreptomicina (Conway *et al.*, 2004).

Os modelos convencionais são aqueles em que a microflora intestinal não é directamente manipulada, e que, portanto, mais se aproxima das condições em que estes organismos se encontram na natureza. Note-se que, à excepção de algumas experiências específicas de colonização controlada, tanto este tipo de modelos como os restantes são

mantidos em condições SPF (do inglês *specific pathogen-free*), o que significa que, os ratinhos são mantidos sem microrganismos que sejam reconhecidos internacionalmente como patogênicos (Macpherson e Harris, 2004). A grande desvantagem dos modelos convencionais é a resistência que o seu intestino oferece a novos eventos de colonização (Conway *et al.*, 2004). Como as experiências a realizar no contexto deste trabalho se baseavam na colonização de ratinhos, este modelo não foi escolhido.

Um outro tipo de modelos, os modelos isentos de micróbios, não apresentam microflora, e, ao contrário dos anteriores, são facilmente colonizáveis (Conway *et al.*, 2004). Com base nesta propriedade, é possível controlar a composição do microbioma e até avaliar qual a influência que a inoculação de uma só espécie bacteriana tem no contexto da biologia do intestino do hospedeiro e no desenvolvimento do seu sistema imunitário (Falk *et al.*, 1998). Contudo, também existem desvantagens consideráveis no uso deste modelo: é mais difícil manipular estes animais e a sua manutenção é mais dispendiosa (Conway *et al.*, 2004), visto que é necessário mantê-los em câmaras estéreis (Macpherson e Harris, 2004). Além disso, os intestinos dos modelos deste tipo têm uma fisiologia muito diferente daquela que se encontra em modelos convencionais, tanto em relação às características dos tecidos que compõem o intestino como em relação ao tipo de nutrientes que se encontra disponível no seu interior (Conway *et al.*, 2004). Estes modelos também não deverão ser os mais apropriados para estudar os processos de comunicação entre diferentes espécies de bactérias que possam ocorrer em condições naturais no contexto do intestino, visto que, mesmo quando se inoculam ratinhos estéreis com espécies isoladas e conhecidas, é muito difícil recriar as comunidades presentes em modelos convencionais, onde os processos de comunicação são muito provavelmente mais complexos e até diferentes.

O modelo tratado com estreptomicina é, dos três modelos apresentados, aquele que reúne as características mais vantajosas para o presente estudo. Estes ratinhos são mantidos em condições SPF como no caso dos modelos convencionais, e a única diferença em relação à manutenção convencional está na adição do antibiótico estreptomicina à água administrada. A ingestão deste antibiótico elimina alguma da flora intestinal, o que é importante para facilitar a inoculação das estirpes bacterianas que se pretendem estudar. Apesar das alterações que se registam na ecologia do intestino, como o decréscimo de anaeróbios facultativos, e a diminuição da concentração de ácidos gordos de cadeias curtas e ácido sulfídrico (Leatham *et al.*, 2009), o número de bactérias anaeróbias obrigatórias, que são as mais abundantes,

permanece praticamente inalterado (Conway *et al.*, 2004). Assim, os modelos tratados com estreptomicina conservam várias características dos ratinhos convencionais, e que, portanto, são um modelo apropriado para procurar efeitos que possam ter um significado biológico (Leatham *et al.*, 2009). Uma vantagem importante é também a de estes modelos serem de fácil manutenção e relativamente pouco dispendiosos.

Teste preliminar com estreptomicina

A administração de antibióticos pode ser dificultada se os animais se recusam a ingerir a água onde o antibiótico está diluído. Para determinar se os ratinhos bebiam a água à qual foi adicionada estreptomicina, foi medido o seu peso (ver QUADRO 1A, em anexo), uma vez que a não ingestão de água tem como consequência directa a perda de peso (Lisa Bergman, comunicação pessoal).

Como é possível observar no QUADRO 1A, apesar de se verificarem algumas descidas pontuais no peso dos ratinhos, não há diminuições acentuadas. Pelo contrário, como a FIGURA 8 mostra, a média da variação dos pesos dos ratinhos ao longo de cinco dias é positiva para ambos os grupos. O aumento do peso verificado pode explicar-se pelo crescimento dos ratinhos durante os cinco dias. Assim, não havendo diminuições de peso, concluiu-se que os ratinhos do grupo 2 ingeriram água com estreptomicina.

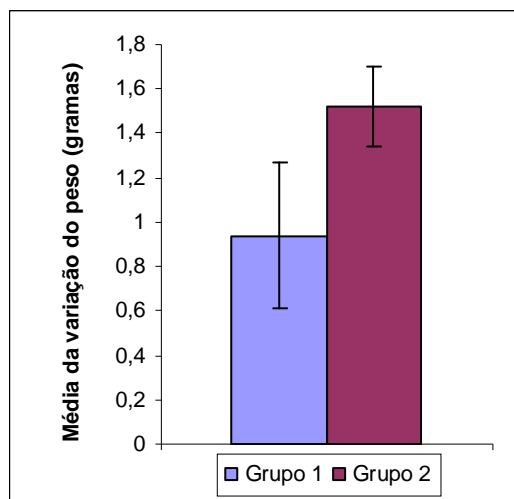


FIGURA 8 | Variação do peso de ratinhos submetidos a tratamento com estreptomicina. Dez ratinhos foram mantidos em condições convencionais SPF e separados em dois grupos de cinco ratinhos. Aos ratinhos do grupo 2 foi administrada água com estreptomicina, enquanto que aos ratinhos do grupo 1 foi administrada água sem antibiótico. Os pesos de cada ratinho foram medidos no dia da adição do antibiótico e cinco dias depois. A variação de peso ocorrida entre os dois dias foi determinada para cada animal, tendo-se calculado a média da variação para cada grupo. Na figura também estão representadas as barras correspondentes ao erro padrão da amostra.

Efeito do tratamento de estreptomicina na microflora de ratinhos

Monitorizar as populações de bactérias no interior do intestino sem recorrer a um método invasivo ou letal para os hospedeiros é bastante difícil. Assim, optou-se por analisar o conteúdo das fezes em bactérias por plaqueamento em meios nutritivos. Para

além desta técnica não ser invasiva, a quantidade de bactérias extraída das fezes reflecte a sua abundância no intestino grosso (Leatham *et al.*, 2009). Como as bactérias da espécie *E. coli* residem no intestino grosso (Conway *et al.*, 2004), então este parece ser um método indicado no contexto da análise. Foi necessário desenvolver e aperfeiçoar previamente uma técnica de processamento das fezes dos ratinhos, no sentido de eliminar as partículas não dissolvidas que permanecem mesmo após a homogeneização das fezes. Estas partículas dificultam não só a pipetagem da amostra, como também poderiam influenciar os resultados caso as bactérias aderissem a elas.

Para ter a certeza de que o tratamento com estreptomicina estava a funcionar, as fezes dos ratinhos dos dois grupos anteriores (ver FIGURA 8) foram analisadas ao longo de alguns dias após o início do tratamento, utilizando o método acima indicado. Os resultados obtidos encontram-se organizados na FIGURA 9.

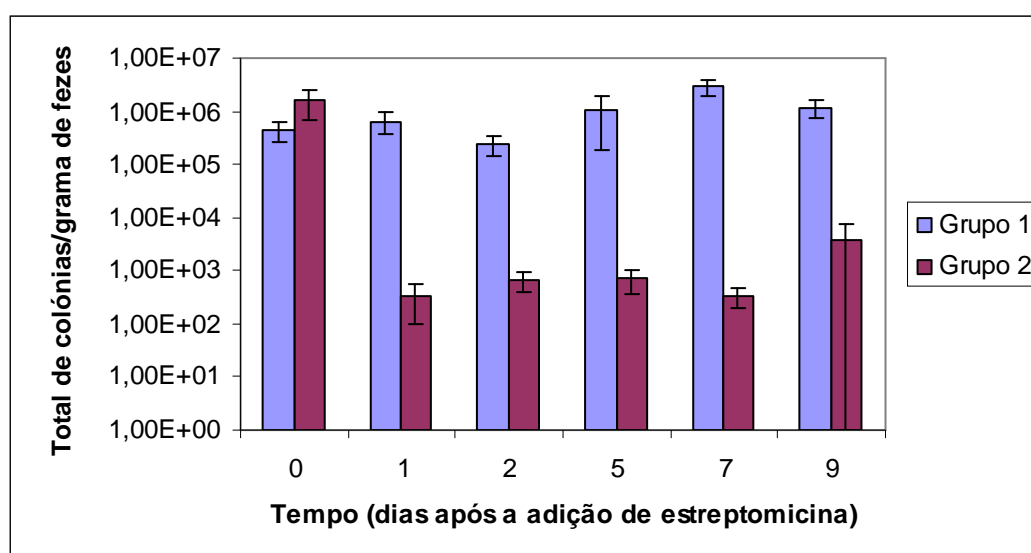


FIGURA 9 | Efeito do tratamento de estreptomicina na microflora tolerante ao oxigénio de ratinhos. Dez ratinhos foram mantidos em condições convencionais SPF e separados em dois grupos de cinco ratinhos. Aos ratinhos do grupo 2 foi administrada água com estreptomicina, enquanto que aos ratinhos do grupo 1 foi administrada água sem antibiótico. Recolheu-se uma amostra das fezes de cada animal 0, 1, 2, 5, 7 e 9 dias após o início do tratamento com estreptomicina. As amostras foram pesadas, processadas, e o seu conteúdo foi plaqueado em meio não selectivo. Após contagem do número total de colónias em placa, os valores foram normalizados para o peso de cada amostra e foi calculada a média de cada grupo. Na figura também estão representadas as barras correspondentes ao erro padrão da amostra. O erro padrão do valor obtido para a média do grupo 2 no dia 9 é muito elevado porque todas as amostras dos ratinhos do grupo 2, excepto uma, não possuíam bactérias (ver QUADRO 2A em anexo).

Como se pode ver na FIGURA 9, os níveis iniciais de bactérias intestinais dos dois grupos eram muito próximos no início, atingindo cerca de 10^6 bactérias/g de fezes ;

porém, a exposição dos ratinhos do grupo 2 ao antibiótico durante apenas um dia fez com que o número médio de bactérias intestinais passasse a ser quase 5000 vezes menor do que era inicialmente, decrescendo de $2 \cdot 10^6$ bactérias/g de fezes para $3 \cdot 10^2$ bactérias/g de fezes. Este resultado mostra que a adição de estreptomicina à água administrada a ratinhos tem um efeito muito significativo na diminuição da flora bacteriana tolerante a oxigênio. A microflora dos ratinhos do grupo 1, por outro lado, manteve-se entre 10^5 e 10^6 bactérias/g de fezes ao longo dos nove dias. Depois do decréscimo muito significativo do número médio de bactérias intestinais dos ratinhos do grupo 2 após o primeiro dia com antibiótico, este número manteve-se baixo até ao sétimo dia, nunca ultrapassando 10^3 bactérias/g de fezes. Só depois de nove dias com o tratamento de estreptomicina é que o número de bactérias intestinais ultrapassou este valor, e, ainda assim, este acontecimento deu-se apenas para o ratinho #10, não se verificando a presença de quaisquer bactérias intestinais para os outros animais do mesmo grupo (ver QUADRO 2A em anexo). Note-se que a manipulação das fezes e incubação das placas foram feitas numa atmosfera com oxigênio, pelo que as bactérias que cresceram em placa foram seleccionadas para a tolerância a esta atmosfera. Apesar de estes resultados não indicarem qual o número total de bactérias presente no intestino dos ratinhos, eles são, no entanto, suficientemente informativos em termos relativos para que se possa concluir que o tratamento de estreptomicina tem um efeito muito significativo na diminuição da flora intestinal tolerante ao oxigênio, e que o efeito se mantém durante pelo menos nove dias. Estes resultados confirmam dados de estudos anteriores que indicam que o tratamento de estreptomicina elimina bactérias anaeróbias facultativas (Conway *et al.*, 2004; Leatham *et al.*, 2009). Neste contexto, encontrando-se o intestino dos ratinhos do grupo 2 com um número médio de bactérias muito menor do que aquele que ocorreria em condições convencionais, conclui-se que estão reunidas as condições para que a inoculação dos ratinhos submetidos a este tratamento com as estirpes construídas seja bem sucedida.

Construção de estirpes resistentes à estreptomicina

A utilização de ratinhos tratados com estreptomicina implica que o tratamento com este antibiótico seja constante ao longo das experiências de inoculação. Assim, quaisquer estirpes que sejam inoculadas têm de ser resistentes à estreptomicina para sobreviverem no ambiente intestinal e o colonizarem. Deste modo, o gene que confere resistência a este antibiótico foi transferido para as estirpes construídas por transdução

com o bacteriófago P1. Neste caso, recorreu-se ao mesmo lisado fágico que tinha sido usado anteriormente porque a estirpe dadora MC4100 de *E. coli* também possui uma mutação no gene *rpsL* que confere resistência à estreptomicina (Heermann *et al.*, 2008). A emissão de fluorescência pelas estirpes DM008 e DM009 construídas foi confirmada por observação de colónias à lupa binocular.

Colonização do ambiente intestinal

Uma vez que a fluorescência das estirpes que produziam YFP era intensa e facilmente detectável por observação de colónias à lupa binocular (ver FIGURA 7, NO21-B), optou-se por colonizar alguns dos dez ratinhos com *E. coli* YFP⁺ (estirpe DM006). Escolheu-se a estirpe com o genótipo $\Delta lacIZYA::cm^R$ YFP⁺ (DM006), e não $\Delta lacIZYA$ YFP⁺ (DM008), porque esta última estirpe ainda não tinha sido construída.

Após terem passado nove dias desde a adição de estreptomicina à água dos ratinhos do grupo 2, foi injectado um inóculo contendo aproximadamente 10^{10} bactérias nos estômagos dos ratinhos #3, #4, #5 (grupo 1), #8, #9 e #10 (grupo 2). Os animais do grupo 2 estiveram submetidos a um tratamento de longa duração com antibiótico de modo a garantir que o número de bactérias eliminado era suficientemente elevado para que a colonização com a estirpe inoculada fosse bem sucedida. Optou-se ainda por administrar as bactérias directamente no estômago, pelo método de gavage, e não indirectamente, pela sua disponibilização na água, comida ou leite fornecidos, para ter a certeza de que todos os ratinhos inoculados recebiam aproximadamente a mesma quantidade inicial de bactérias.

Uma técnica simples para averiguar se houve colonização consiste no plaqueamento do conteúdo das fezes num meio que seleccione as bactérias da estirpe inoculada. Este meio deverá seleccionar as estirpes a estudar de uma forma específica, limitando o crescimento de outras estirpes e o aparecimento de bactérias resistentes à selecção. Um meio que contivesse ampicilina seria, à partida, apropriado para seleccionar a estirpe DM006, visto que a inserção dos genes que codificam as proteínas fluorescentes implica necessariamente a inserção de um gene que confere resistência a este antibiótico. No entanto, o plaqueamento de fezes de ratinhos mantidos em condições convencionais mostrou que existem bactérias resistentes a ampicilina na flora intestinal de ratinhos. Como tal, e para utilizar um meio que seleccionasse especificamente as estirpes a inocular, verificou-se se existiam bactérias simultaneamente resistentes a ampicilina e estreptomicina na microflora de ratinhos

mantidos em condições convencionais. Colheram-se amostras de fezes dos ratinhos do grupo 1 em vários dias e, após processamento, estas foram plaqueadas num meio nutritivo que possuía os dois antibióticos referidos. Em alguns dos dias analisados, não houve qualquer crescimento bacteriano (ver os resultados do grupo 1 para os dias 0, 1 e 2 do QUADRO 3A, em anexo, e os resultados para os dias 7 e 14 do QUADRO 3, abaixo indicados). Porém, para a maior parte das amostras recolhidas noutros dias, verificou-se crescimento bacteriano (ver os resultados do grupo 1 para os dias 5 e 7 do QUADRO 3A, em anexo, e os resultados para os dias 0 e 3 do QUADRO 3, abaixo indicados). Estes últimos resultados levariam a concluir que algumas bactérias resistentes a ampicilina e estreptomicina fazem parte da microflora intestinal convencional de ratinhos. Contudo, nunca foi verificado crescimento bacteriano em placas com estes dois antibióticos para as amostras de fezes dos ratinhos do grupo 2 durante nove dias, mesmo após o início do tratamento com estreptomicina. O resultado mencionado permite concluir que a presença desta pressão selectiva não é suficiente para que apareçam bactérias resistentes aos dois antibióticos, pelo menos durante os nove primeiros dias de exposição a estreptomicina. Neste contexto, a hipótese de que algumas bactérias resistentes a ampicilina e estreptomicina façam parte da microflora intestinal convencional de ratinhos não é plausível. Se elas existissem, a presença de estreptomicina eliminaria em pouco tempo grande parte da flora intestinal convencional (ver FIGURA 9), e as bactérias duplamente resistentes teriam muito mais nutrientes disponíveis que poderiam utilizar para se multiplicarem, o que permitiria a sua detecção em placa. A hipótese de que as bactérias observadas que eram provenientes dos ratinhos do grupo 1 fossem uma contaminação da estirpe DM006 também não é plausível, uma vez que as colónias obtidas não apresentavam fluorescência quando analisadas à lupa binocular. Como o aparecimento de colónias duplamente resistentes em amostras de ratinhos criados em condições convencionais não voltou a aparecer, é provável que o crescimento observado no caso dos ratinhos do grupo 1 (dias 5 e 7 no QUADRO 3A e dias 0 e 3 no QUADRO 3) foi excepcional, devendo-se provavelmente a uma degradação parcial dos antibióticos. A haver degradação, esta não foi total, visto que a média de colónias observadas em meio selectivo para o grupo 1 é de $1,1 \cdot 10^4$ colónias/g de fezes, um valor que é 100 vezes mais baixo que a média de colónias que cresce usualmente em placa sem antibióticos nas condições de incubação utilizadas ($1,1 \cdot 10^6$ colónias/g de fezes). Contudo, se os antibióticos se tivessem degradado parcialmente, o crescimento de bactérias resistentes a baixas concentrações destes compostos seria possível, de acordo com o que foi

discutido acima. Além disso, o crescimento verificado está circunscrito ao número de placas presente numa só embalagem, o que leva a crer que este se tratava de um problema de preparação do meio com antibiótico.

Tendo em conta as considerações apresentadas, concluiu-se que o meio com ampicilina e estreptomicina permite a detecção específica das estirpes a inocular. Após a inoculação, o conteúdo das amostras de fezes recolhidas de cada um dos ratinhos foi plaqueado no meio mencionado, e os resultados foram registados (ver QUADRO 3).

QUADRO 3 | Verificação da colonização do ambiente intestinal de ratinhos submetidos a um tratamento de estreptomicina com *E. coli* YFP⁺.

Os ratinhos #6 a #10 foram submetidos a um tratamento de estreptomicina durante nove dias. Após estes nove dias, os ratinhos #3, #4, #5, #8, #9 e #10 (linhas a sombreado) foram inoculados com cerca de 10^{10} bactérias de *E. coli* YFP⁺ (estirpe DM006). As fezes de todos os ratinhos foram recolhidas no dia da inoculação e 3, 7 e 14 dias depois. Cada amostra foi processada e plaqueada em meio selectivo com ampicilina e estreptomicina sem ter sido previamente diluída. Os valores referem-se ao número total de colónias por grama de fezes recolhidas.

Grupo	Água administrada	Ratinho	Dias após a inoculação			
			0	3	7	14
1	sem estreptomicina	1	3,3 E3	3,7 E3	0	0
		2	2,8 E4	1,7 E4	0	0
		3	1,0 E4	5,5 E3	ND	0
		4	5,1 E4	0	0	0
		5	7,3 E3	1,9 E3	0	0
2	com estreptomicina	6	0	confl.	confl.	confl.
		7	0	confl.	confl.	confl.
		8	0	confl.	confl.	confl.
		9	0	confl.	confl.	confl.
		10	0	confl.	confl.	confl.

Legenda | confl.: crescimento confluento observado após plaqueamento de amostra não diluída; **E:** expoente de base 10; **ND:** não determinado

Como se pode ver no QUADRO 3, os resultados obtidos três dias após a inoculação dos ratinhos #8, #9 e #10 mostram que o número de bactérias resistentes aos dois antibióticos usados aumenta, num curto espaço de tempo, de zero para um número demasiado alto para poder ser determinado na diluição utilizada. Na verdade, este resultado mantém-se 3, 7 e 14 dias após a inoculação. Este período de tempo é suficiente para que vários trânsitos intestinais de nutrientes se completem, e para que o sistema imunitário do hospedeiro elimine um foco de infecção. Como bactérias resistentes à ampicilina e à estreptomicina continuam a encontrar-se nas fezes dos ratinhos #8, #9 e #10 14 dias após a inoculação da estirpe DM006, então conclui-se que:

(1) mesmo que grande parte tenha sido eliminada no estômago e pelas fezes, há pelo menos uma fracção que conseguiu colonizar o intestino e que (2) esta população foi tolerada pelo sistema imunitário do hospedeiro. Uma amostra das bactérias que cresceram no meio selectivo usado foi analisada, e confirmou-se a presença de fluorescência devida a YFP em todos os casos, o que corrobora a conclusão.

Os resultados obtidos para os ratinhos #6 e #7 são interessantes neste contexto, uma vez que, mesmo não tendo sido directamente inoculados no estômago como os ratinhos #8, #9 e #10, estes animais também apresentam bactérias resistentes a ambos os antibióticos, o que leva a crer que houve colonização do seu ambiente intestinal. Esta hipótese é corroborada porque foi detectada fluorescência devida à presença de YFP em amostras das bactérias intestinais provenientes dos ratinhos #6 e #7. O resultado observado pode ser explicado pela proximidade física dos ratinhos #6, #7, #8, #9 e #10. Os cinco ratinhos mencionados partilham o mesmo espaço, bem como a mesma comida e água com estreptomicina. Como tal, estão em contacto com as fezes dos outros ratinhos, que, como mostra o QUADRO 3, possuem bactérias da estirpe inoculada. É provável que este resultado não se deva apenas ao contacto com as fezes, mas sobretudo porque os ratinhos criados nestas condições apresentam um comportamento frequente: a ingestão de fezes (Lisa Bergman, comunicação pessoal). Esta é provavelmente a principal forma de transmissão da estirpe DM006 para os ratinhos #6 e #7.

Por outro lado, os resultados obtidos para os ratinhos #3, #4 e #5 estão de acordo com estudos publicados (Conway *et al.*, 2004). Estes ratinhos não foram submetidos a tratamento com estreptomicina, e, tal como está descrito na literatura, a presença de uma microflora bem estabelecida em ratinhos convencionais oferece resistência a eventos de colonização. Assim, os resultados obtidos permitiram concluir que o número de bactérias que se encontram no intestino de ratinhos é um factor mais importante para a existência de um evento de colonização do que o modo como as bactérias são transmitidas.

Quantificação do nível de colonização por contagem em placa

O objectivo do presente trabalho de investigação é comparar os níveis de colonização intestinal de diferentes estirpes de *E. coli*. A quantificação do número de bactérias de cada estirpe presente nas fezes dos ratinhos é uma abordagem que permite a comparação directa entre níveis de colonização. Não foi possível quantificar o número de bactérias presentes nos intestinos dos animais em análise durante os primeiros dias

após inoculação porque foram plaqueadas amostras não diluídas, e o crescimento foi confluyente (ver QUADRO 3). Para além disso, quando as amostras eram diluídas previamente, o número de colónias obtido em placa era muito variável, o que fazia com que os resultados não fossem conclusivos. Assim, foi necessário otimizar o protocolo utilizado para que os resultados fossem consistentes e reprodutíveis, o que demorou algumas semanas, e por isso os resultados só puderam ser quantificados 39 dias após a inoculação (ver QUADRO 4).

QUADRO 4 | Quantificação de bactérias *E. coli* YFP⁺ inoculadas.

As fezes dos ratinhos #4, #6, #7, #8 e #10 foram processadas 39 dias após o evento de inoculação, e o seu conteúdo foi plaqueado em meio selectivo com ampicilina e estreptomina de modo a determinar o número de bactérias *E. coli* YFP⁺ (estirpe DM006) inoculadas que colonizavam o ambiente intestinal naquele momento. O número de bactérias foi normalizado pelo peso das fezes recolhidas.

Grupo	Água administrada	Ratinho	Número de bactérias (cfu/g de fezes)
1	sem estreptomina	4	0
2	com estreptomina	6	3,91 E8
		7	3,77 E8
		8	2,95 E8
		10	4,43 E8

Legenda | cfu: unidade formadora de colónia; E: expoente de base 10

A partir dos resultados presentes no QUADRO 4 é possível extrair várias informações. A presença de duplos resistentes nos ratinhos #6, #7, #8 e #10 do grupo 2 e a sua ausência no ratinho #4 do grupo 1 estão de acordo com os resultados do QUADRO 3, indicando que só houve colonização nos ratinhos que foram submetidos ao tratamento de estreptomina (grupo 2). Para além disso, os níveis de colonização para os diferentes ratinhos do grupo 2 são muito semelhantes, o que indica que tanto a inoculação por gavagem realizada nos ratinhos #8 e #10, como o evento de inoculação indirecta que ocorreu no caso dos ratinhos #6 e #7, levam ao estabelecimento de níveis de colonização aproximadamente iguais. Os valores obtidos estão dentro da mesma ordem de grandeza dos valores que foram determinados por outros estudos, 10^7 a 10^8 bactérias/g de fezes (Conway, *et al.*, 2004). Deve-se notar ainda que estes são resultados que correspondem às bactérias presentes 39 dias após gavagem, o que leva a concluir que a colonização atinge níveis elevados mesmo depois de ter passado um longo período de tempo desde a inoculação.

Estes resultados favorecem a hipótese de que o factor determinante para que se obtenham níveis de colonização elevados são as condições em que o ambiente intestinal do hospedeiro se encontra, e não o modo de colonização.

Quantificação do nível de colonização por citometria de fluxo

Como seria necessário proceder ao plaqueamento do conteúdo das fezes de um grande número de ratinhos para análise dos níveis de colonização bacteriana em experiências subsequentes, e como esta é uma técnica morosa, procurou-se desenvolver uma forma mais rápida de contar as bactérias inoculadas. A contagem de células por citometria de fluxo é uma técnica muito utilizada em Imunologia e que permite uma detecção específica de fluorescência devida a várias moléculas. Para que a contagem fosse bem sucedida, foi necessário avaliar se as bactérias marcadas com YFP podiam ser detectadas após processamento das amostras.

O processamento das fezes dos ratinhos com o protocolo desenvolvido permite que muitos detritos presentes nas fezes possam ser eliminados por filtração. Contudo, os detritos de menores dimensões não são excluídos, e portanto ainda permanecem nas amostras processadas. Como a FIGURA 10-A mostra, só 0,38% das partículas detectadas correspondem às bactérias fluorescentes inoculadas, visto que só elas apresentam as

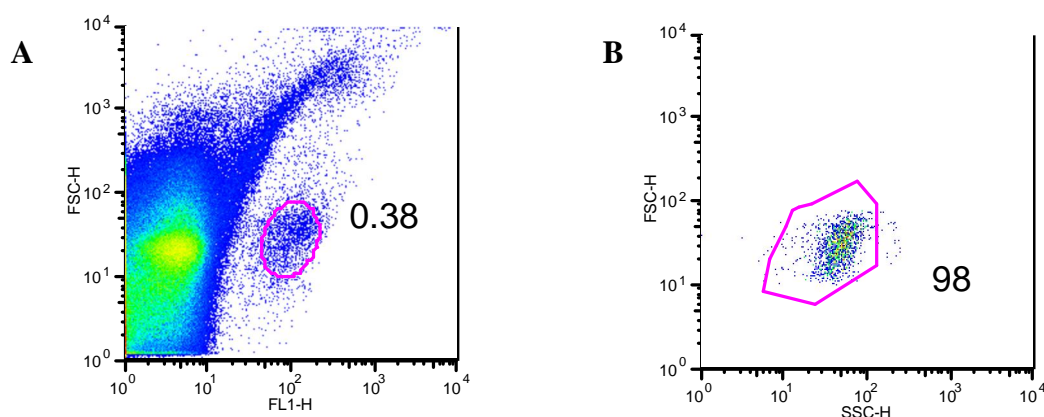


FIGURA 10 | Análise das amostras de fezes de ratinhos inoculados com *E. coli* YFP⁺ por citometria de fluxo. Fezes dos ratinhos #4 (grupo 1), #6, #7, #8 e #10 (grupo 2) foram colhidas 39 dias após o evento de inoculação, sendo em seguida processadas e, por fim, analisadas através de um citómetro de fluxo. (A) Delimitação da população de partículas fluorescentes presentes na amostra #6 que correspondem a *E. coli* YFP⁺ (estirpe DM006). (B) Total de partículas fluorescentes na amostra. A população delimitada em (A) corresponde a 98% das partículas que são fluorescentes, o que significa que outras partículas presentes na amostra praticamente não apresentam fluorescência. **Legenda | FL1-H:** intensidade de fluorescência devida a YFP; **FSC-H:** tamanho das partículas da amostra; **SSC-H:** granulosidade das partículas presentes na amostra.

dimensões típicas de células de *E. coli* e um sinal de fluorescência muito intenso. Para efectuar uma contagem precisa das bactérias fluorescentes na amostra é conveniente delimitar uma região a analisar, de modo a não sobrecarregar o aparelho e para que a análise seja mais rápida. Assim, restringiu-se a análise à região marcada na FIGURA 10-A. Como é possível notar na FIGURA 10-B, a população escolhida engloba 98% de todas as partículas que têm uma fluorescência elevada, o que significa que praticamente toda a fluorescência da amostra é devida à presença da estirpe DM006, e não aos detritos que lá se encontram. Esta condição é essencial para que a contagem seja específica para as bactérias fluorescentes e os resultados sejam fidedignos.

A contagem do número de bactérias da estirpe DM006 foi feita para amostras de fezes dos ratinhos #4 (grupo 1), #6, #7, #8 e #10 (grupo 2). Como se pode ver na FIGURA 11, só é possível detectar uma população com um nível de fluorescência devido a YFP num ratinho que foi colonizado pela estirpe DM006 (ver FIGURA 11-B), e não num ratinho que não foi colonizado por esta estirpe (ver FIGURA 11-A). Foram obtidos resultados semelhantes aos da FIGURA 11-B para as amostras #7, #8 e #10 (ver FIGURA 1A, em anexo).

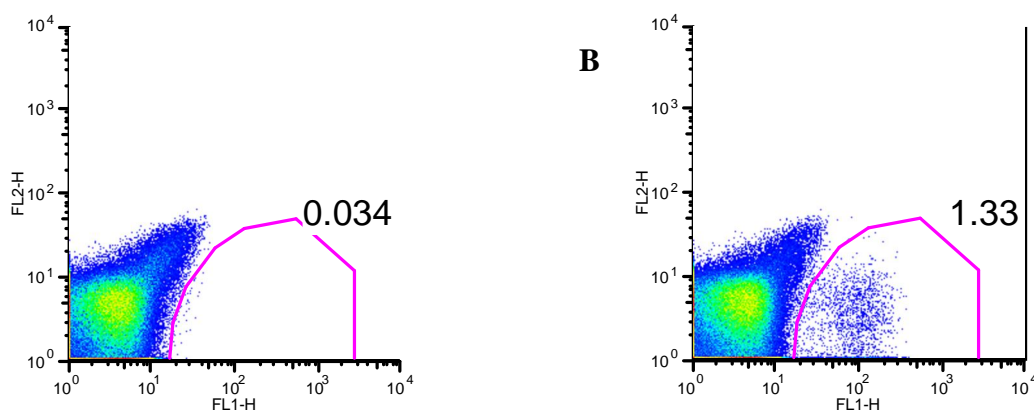


FIGURA 11 | Contagem de bactérias fluorescentes em amostras de fezes de ratinhos inoculados com *E. coli* YFP⁺. Fezes dos ratinhos #4 (grupo 1), #6, #7, #8 e #10 (grupo 2) foram colhidas 39 dias após o evento de inoculação, sendo em seguida processadas e, por fim, analisadas através de um citómetro de fluxo. A contagem recaiu sobre a população previamente delimitada (ver FIGURA 10-A) para cada uma das amostras. (A) A amostra #4, que provém de um ratinho que não se encontra colonizado com *E. coli* YFP⁺ (estirpe DM006), apresenta níveis de fluorescência muito baixos (apenas 0,034% da população delimitada na FIGURA 11). (B) A amostra #6, que provém de um ratinho que está colonizado com *E. coli* YFP⁺, apresenta níveis de fluorescência muito elevados para uma parcela da população (1,33% da população delimitada na FIGURA 11). Apesar de este valor ainda ser baixo em termos percentuais, é, contudo, mais elevado do que a proporção de bactérias da espécie *E. coli* que se encontra nos intestinos de mamíferos mantidos em condições convencionais (menos de 1%). **Legenda | FL1-H:** intensidade de fluorescência devida a YFP; **FL2-H:** sem significado

Comparação entre métodos de quantificação

As contagens obtidas por citometria de fluxo foram comparadas com os valores anteriormente obtidos por plaqueamento das amostras no meio selectivo escolhido. Como se pode ver na FIGURA 12, as contagens de bactérias da estirpe DM006 determinadas pelo citómetro de fluxo aproximaram-se muito dos valores obtidos por crescimento em placa. Assim, concluiu-se que a técnica de contagem de bactérias fluorescentes que foi desenvolvida utilizando um citómetro de fluxo leva a resultados consistentes. Ainda que as técnicas mencionadas permitam obter resultados muito semelhantes, é de notar que a técnica desenvolvida apresenta mais vantagens: é simples, menos morosa que o plaqueamento de todas as amostras, tem um menor erro associado e permite obter resultados no próprio dia da análise. Por estes motivos, concluiu-se então que a técnica de citometria de fluxo deve ser preferida sempre que possível para contabilizar bactérias que possuam marcadores fluorescentes de sinal intenso.

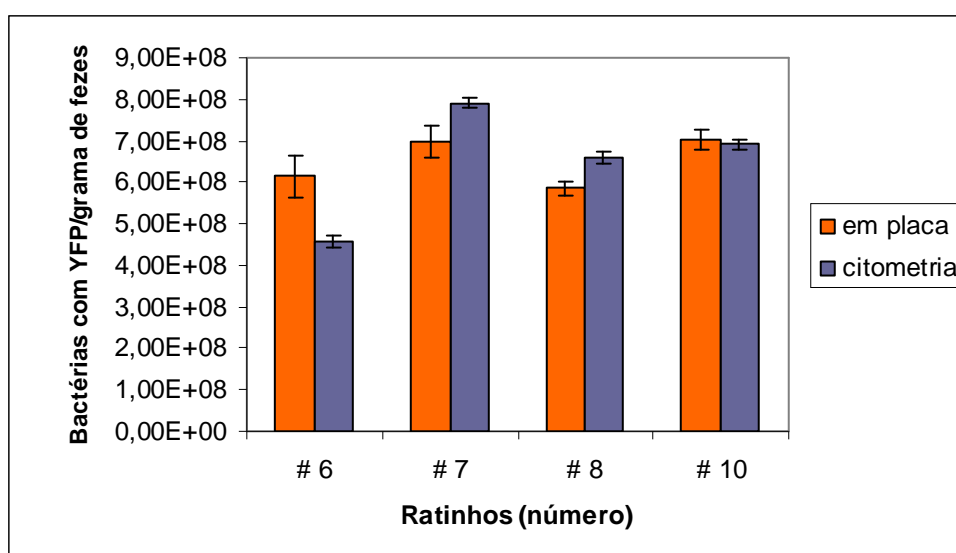


FIGURA 12 | Comparação entre diferentes métodos para a contagem de *E. coli* YFP⁺. Amostras de fezes provenientes dos ratinhos #6, #7, #8 e #10 (grupo 2), cujo intestino se encontrava colonizado com *E. coli* YFP⁺ (estirpe DM006), foram processadas para contagem do número de bactérias desta estirpe. Uma parte de cada uma das amostras foi plaqueada em meio selectivo com ampicilina e estreptomicina, e as colónias resultantes foram contadas. Outra parte de cada uma das amostras foi analisada num citómetro de fluxo, onde as bactérias fluorescentes foram contabilizadas. O gráfico mostra os resultados obtidos em cada um dos casos. Na figura também estão representadas as barras correspondentes ao erro padrão da amostra.

Visualização de bactérias directamente nas fezes

Para além das análises para a quantificação do número de bactérias presente nas fezes dos ratinhos, também se procurou obter mais informações acerca da sua

distribuição no interior do intestino. Uma primeira abordagem neste sentido foi o desenvolvimento de uma técnica para visualizar as bactérias colonizadoras do ambiente intestinal directamente a partir de amostras de fezes recolhidas de ratinhos que foram inoculados com a estirpe DM006. Amostras de fezes não submetidas ao tratamento anterior a plaqueamentos foram imobilizadas em gel de agarose e observadas a um microscópio de fluorescência. As imagens da FIGURA 13 mostram os resultados obtidos.

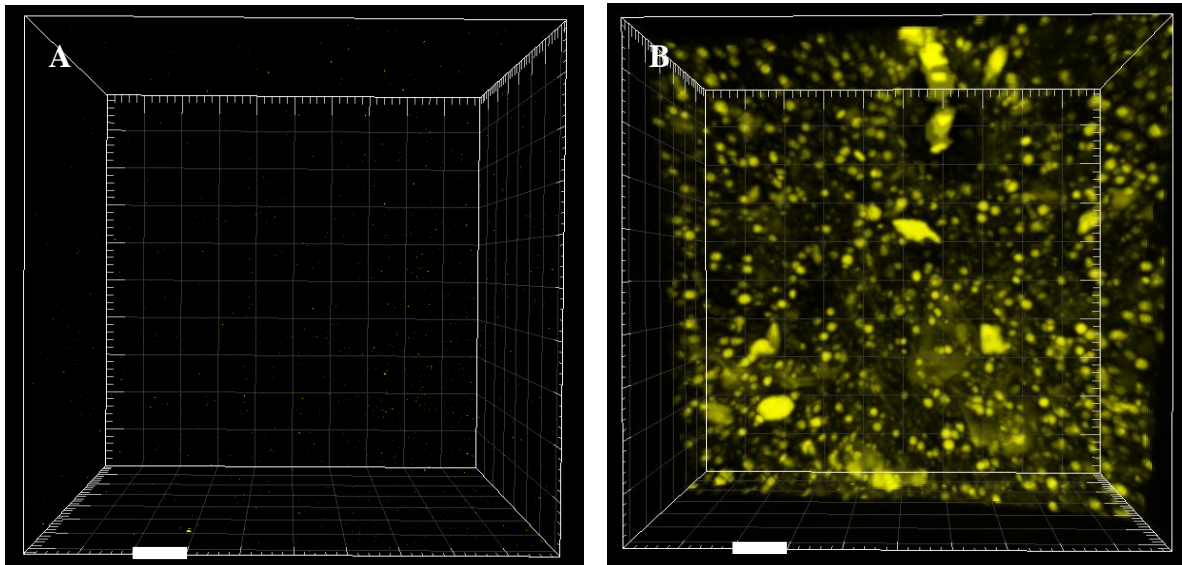


FIGURA 13 | Visualização de bactérias fluorescentes nas fezes de ratinhos colonizados com *E. coli* YFP⁺. Dez ratinhos foram mantidos em condições convencionais SPF e separados em dois grupos de cinco ratinhos. Aos ratinhos do grupo 2 foi administrada água com estreptomicina, enquanto que aos ratinhos do grupo 1 foi administrada água sem antibiótico. Os ratinhos #3, #4, #5 (grupo 1), #8, #9 e #10 (grupo 2) foram inoculados com cerca de 10^{10} bactérias de *E. coli* YFP⁺ (estirpe DM006) nove dias depois do início do tratamento com estreptomicina. 34 dias depois da adição do antibiótico, recolheu-se uma amostra das fezes dos ratinhos #3 (grupo 1) e #6 (grupo 2). As amostras foram imobilizadas em agarose e várias secções de uma porção aleatoriamente escolhida de cada amostra foram observadas ao microscópio de fluorescência por análise confocal. Cada conjunto de secções foi compilado para reconstrução tridimensional. (A) Reconstrução da amostra do ratinho #3. (B) Reconstrução da amostra do ratinho #6.

As imagens da FIGURA 13 corroboram as hipóteses anteriores. Como se pode observar na imagem (A) da FIGURA 13, os níveis de fluorescência detectados foram muito baixos, o que está de acordo com a hipótese de que os ratinhos do grupo 1 não foram colonizados pela estirpe DM006. Quanto à imagem (B) da FIGURA 13, é possível notar que existem várias zonas que apresentaram níveis de fluorescência dentro da gama dos comprimentos de onda emitidos por YFP muito elevados, o que está de acordo com a hipótese de que os ratinhos do grupo 2 foram colonizados pela estirpe fluorescente

introduzida. Em relação àquilo que é possível observar na imagem **(B)**, nota-se que a maior parte das zonas fluorescentes têm uma distribuição espacial elipsóide ou esférica. A dimensão destas zonas leva a crer que elas sejam constituídas por várias bactérias fluorescentes, à semelhança daquilo que acontece quando bactérias isoladas crescem em placas de Petri (comparar com a imagem NO21-B da FIGURA 7). Assim, é provável que estas zonas representem micro-colónias de bactérias fluorescentes. Porém, não é possível concluir algo acerca da distribuição das bactérias inoculadas no interior do intestino grosso, uma vez que o material que irá dar origem às fezes é misturado frequentemente devido a contracções que ocorrem no tecido muscular deste órgão (Sherwood, 2007), e, portanto, a distribuição e arquitectura dos locais onde estas bactérias se encontram no interior do intestino devem ser alterados muito significativamente durante o processo.

Verificação da neutralidade dos marcadores fluorescentes

O principal objectivo do presente trabalho de investigação é comparar níveis de colonização intestinal em ratinhos por parte de estirpes de *E. coli* inoculadas que apresentem mutações em genes essenciais para os processos de detecção de quórum mediados por AI-2. No estudo realizado, optou-se por inocular estirpes que possuíssem uma deleção do gene *luxS*, o gene que codifica a enzima produtora do sinal AI-2, e comparar o seu nível de colonização com o de uma estirpe isogénica que não possuísse a mutação. Para além destas experiências, também foi realizada a inoculação conjunta das duas estirpes mencionadas, de modo a compreender se haveria alguma vantagem adaptativa de uma em relação à outra.

Para poder quantificar o nível de colonização de cada estirpe, usaram-se dois marcadores fluorescentes (YFP e CFP). Uma condição essencial para poder concluir se há diferenças entre os níveis de colonização intestinal das estirpes inoculadas que sejam devidas a uma desregulação dos processos de comunicação mediados por AI-2, é garantir que nenhum dos dois marcadores usados confere à estirpe que o possui uma vantagem adaptativa significativa em relação à outra estirpe. Assim, as várias combinações de estirpes a inocular foram colocadas em meio nutritivo e quantificadas à medida que se multiplicavam. Cada meio foi inoculado com quantidades iniciais aproximadamente iguais de indivíduos de cada estirpe, e as proporções relativas YFP/CFP foram determinadas ao longo do tempo, como mostra a FIGURA 14.

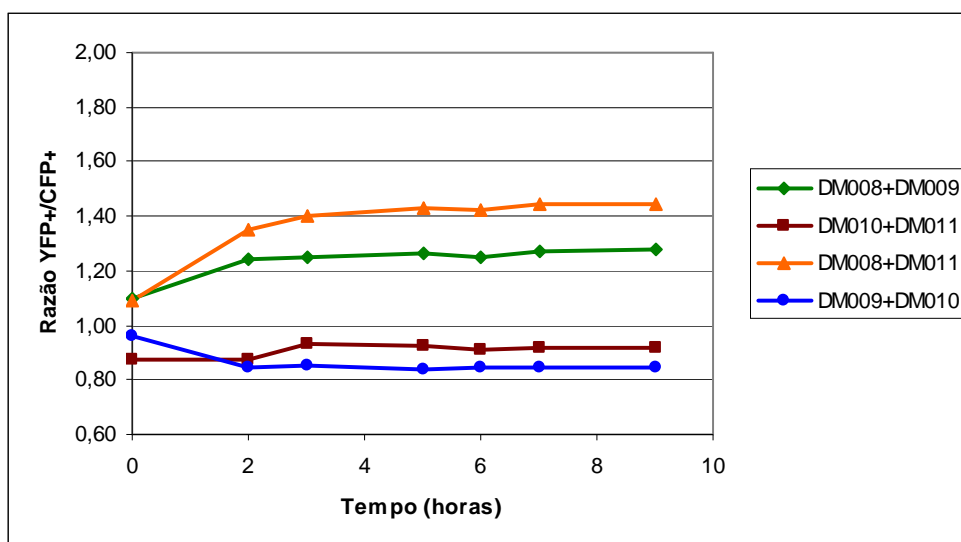


FIGURA 14 | Verificação da neutralidade dos marcadores fluorescentes utilizados para identificar as estirpes a colonizar. Combinações de duas das estirpes de *E. coli* YFP⁺ (DM008), CFP⁺ (DM009), $\Delta luxS$ YFP⁺ (DM010) e $\Delta luxS$ CFP⁺ (DM011) foram crescidas em quatro erlenmeyers contendo meio nutritivo. Cada erlenmeyer foi inoculado com quantidades aproximadamente iguais das estirpes YFP⁺ e CFP⁺, $\Delta luxS$ YFP⁺ e $\Delta luxS$ CFP⁺, YFP⁺ e $\Delta luxS$ CFP⁺ ou CFP⁺ e $\Delta luxS$ YFP⁺. Os erlenmeyers foram incubados durante várias horas, e foram tiradas amostras para análise por citometria de fluxo no início da incubação e 2h, 3h, 5h, 6h, 7h e 9h depois.

As razões obtidas para os quatro grupos são próximas de 1, o que indica que o número de células com YFP não se desvia significativamente do número de células com CFP. Apesar das razões obtidas não serem exactamente 1, os desvios observados nunca são maiores que cerca de 40%, e, na verdade, durante a maior parte do tempo (das 2h às 9h de incubação), a proporção YFP/CFP mantém-se essencialmente constante. Os desvios em relação à proporção esperada de 1:1 praticamente só aumentaram durante as primeiras 2h de incubação, nas quais se dá a passagem da fase de latência para a fase exponencial de crescimento bacteriano. Os resultados obtidos também mostram que os maiores desvios são observados quando uma das estirpes que não possui o gene *luxS* (DM010 ou DM011) é incubada com uma estirpe que possui este gene (DM008 ou DM009), e que em ambos os casos há um maior crescimento das estirpes que possuem o gene. Contudo, esta diferença é pequena e não parece ser significativa. Assim, concluiu-se que nenhum dos marcadores confere uma vantagem adaptativa que seja significativa a uma das estirpes que os possuem.

Identificação simultânea de fluorescência de YFP e CFP

Antes de analisar os resultados da inoculação conjunta de duas estirpes de *E. coli* isogénicas que diferem apenas no marcador fluorescente que possuem (YFP ou CFP), é

necessário verificar se ambos os marcadores conseguem ser detectados em simultâneo pelo citómetro e, em caso afirmativo, se as contagens efectuadas através deste aparelho para as bactérias marcadas com CFP são concordantes com os valores obtidos após plaqueamento em meio selectivo. Ao contrário dos resultados que se obtiveram para as bactérias da estirpe DM006, o sinal de CFP da estirpe DM007 não é tão intenso (ver FIGURA 15-B). Na verdade, este sinal sobrepõe-se parcialmente ao sinal da população que não é fluorescente, o que não permite quantificar com exactidão as bactérias da estirpe DM007 (ver FIGURA 2A, em anexo). Como tal, concluiu-se que o método de citometria de fluxo não é o mais indicado para a detecção simultânea de amostras de fezes com as estirpes DM006 e DM007. Neste caso, a alternativa mais indicada passa a ser a quantificação por plaqueamento em meio selectivo. Note-se, contudo, que o método de contagem utilizando o citómetro de fluxo poderá ser aplicado sempre que as estirpes em estudo tenham um sinal de fluorescência suficientemente intenso para que a população de células fluorescentes esteja bem separada das regiões correspondentes a células não fluorescentes e a detritos que ainda se encontrem nas amostras processadas.

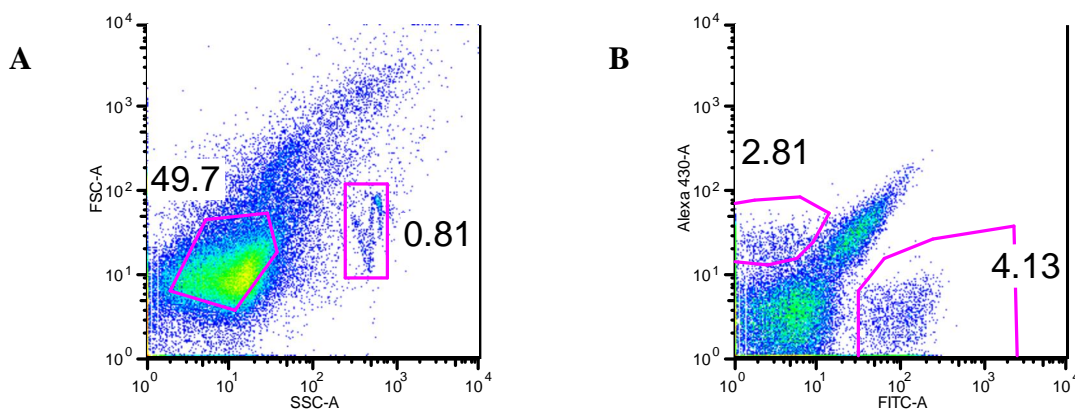


FIGURA 15 | Contagem de bactérias fluorescentes em amostras de fezes de ratinhos inoculados com estirpes YFP⁺ e CFP⁺ de *E. coli*. Três ratinhos foram mantidos em condições convencionais SPF e foi-lhes administrada água com estreptomicina durante três dias. No terceiro dia, todos os ratinhos foram inoculados com $1,85 \cdot 10^8$ bactérias de *E. coli* YFP⁺ (estirpe DM006) e $1,77 \cdot 10^8$ bactérias de *E. coli* CFP⁺ (estirpe DM007). Três dias depois da inoculação, amostras de fezes de todos os ratinhos foram colhidas e processadas para quantificação através de um citómetro de fluxo. A contagem recaiu sobre uma população previamente delimitada (A) de acordo com o processo seguido anteriormente (ver FIGURA 11). O gráfico (B) indica as proporções das populações fluorescentes devido à presença de YFP (4,13%) ou CFP (2,81%). Note-se que esta última população se sobrepõe consideravelmente à população não fluorescente (ver FIGURA 2A, em anexo). **Legenda | Alexa 430-A:** intensidade de fluorescência devida a CFP; **FITC-A:** intensidade de fluorescência devida a YFP; **FSC-H:** tamanho das partículas da amostra; **SSC-H:** granulosidade das partículas presentes na amostra.

Experiência de co-colonização

Depois de estabelecidos os protocolos de inoculação de ratinhos com estirpes construídas, e depois de otimizadas as técnicas de processamento de fezes e os procedimentos para contagem do número de colónias, foram inoculadas quatro combinações de estirpes de *E. coli* marcadas com proteínas fluorescentes em quatro grupos de ratinhos de cinco indivíduos cada. Cada grupo foi inoculado com as estirpes: YFP⁺ (DM008) e CFP⁺ (DM009) para o Grupo 1 (G1), $\Delta luxS$ YFP⁺ (DM010) e $\Delta luxS$ CFP⁺ (DM011) para o Grupo 2 (G2), YFP⁺ (DM008) e $\Delta luxS$ CFP⁺ (DM011) para o Grupo 3 (G3) ou CFP⁺ (DM009) e $\Delta luxS$ YFP⁺ (DM010) para o Grupo 4 (G4). Após contagem do número de bactérias intestinais, as proporções entre estirpes foram determinadas (ver FIGURA 16).

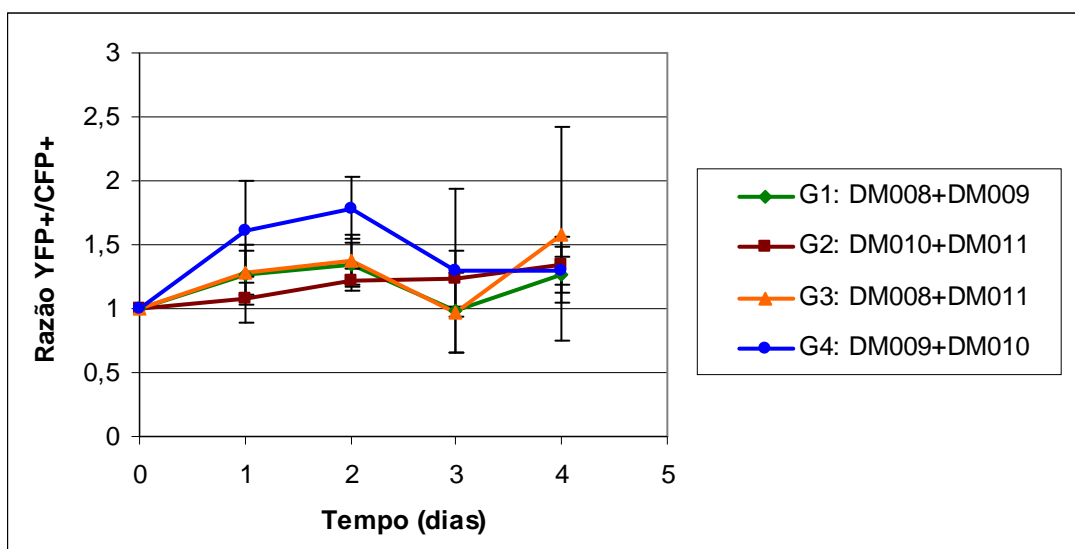


FIGURA 16 | Influência do gene *luxS* na colonização do ambiente intestinal de ratinhos por *E. coli*. Combinações de duas das estirpes de *E. coli* YFP⁺ (DM008), CFP⁺ (DM009), $\Delta luxS$ YFP⁺ (DM010) ou $\Delta luxS$ CFP⁺ (DM011) em iguais proporções foram injectadas em ratinhos previamente submetidos a um tratamento com estreptomicina. Durante os quatro primeiros dias após a inoculação foram colhidas amostras de fezes de todos os ratinhos. Estas foram processadas e quantificadas por contagem em placa, determinando-se em seguida as proporções YFP/CFP. Os valores referem-se à média de cada grupo. Na figura também estão representadas as barras correspondentes ao erro padrão da amostra.

Como os resultados da FIGURA 16 mostram, as proporções entre células produtoras de YFP/CFP são muito semelhantes *in vivo* em qualquer um dos grupos, o que está em consonância com os resultados obtidos *in vitro*, quando as bactérias cresceram apenas em meio de cultura (comparar com a FIGURA 14). No caso das

proporções medidas após permanência no ambiente intestinal de ratinhos, os desvios a uma proporção 1:1 são maiores, mas o erro associado a cada valor também é maior. Este facto está relacionado com a existência de uma maior variabilidade associada ao método de quantificação das bactérias intestinais presentes nas fezes. Apesar disso, os desvios continuam a ser pouco pronunciados. Assim, com base nos resultados obtidos, concluiu-se que (1) a presença do gene que codifica a proteína produtora do sinal AI-2 não tem qualquer influência no nível de colonização intestinal das estirpes de *E. coli* inoculadas em ratinhos, e que (2) a presença do gene *luxS* não confere nenhuma vantagem adaptativa durante o evento de colonização.

A conclusão apontada pode ser explicada por duas hipóteses distintas. Por um lado, a presença do gene *luxS* em *E. coli* pode não ter qualquer influência na colonização do ambiente intestinal porque a sinalização via AI-2 não leva à regulação de comportamentos em *E. coli* que promovem a colonização. Apesar de ter sido demonstrado por estudos anteriores que a sinalização via AI-2 induz a formação de biofilmes em *E. coli* (Barrios *et al.*, 2006; Herzberg *et al.*, 2006), é possível que a sua formação não seja uma condição essencial para a colonização do intestino de mamíferos. Na verdade, estudos sobre a colonização do órgão luminoso de *Euprymna scolopes* por bactérias da espécie *Vibrio fischeri* mostram que o muco segregado pelo hospedeiro desempenha um papel muito importante nos processos de adesão e colonização (Nyholm e McFall-Ngai, 2004). Do mesmo modo, os estudos sobre a colonização do ambiente intestinal de roedores levada a cabo por bactérias da espécie *E. coli* mostram que a capacidade para crescer e sobreviver no muco intestinal parecem ser factores fundamentais a uma colonização bem sucedida (Conway *et al.*, 2004). Pela sua composição e características (Conway *et al.*, 2004), o muco produzido pelo hospedeiro poderá fornecer o substrato ideal para *E. coli*, aumentando as probabilidades de colonização ao permitir que as bactérias não tenham de gastar energia que possam utilizar para se multiplicarem e produzir moléculas necessárias à formação do biofilme. Para avaliar a importância do muco produzido pelo hospedeiro na colonização intestinal de *E. coli*, seria necessário repetir a experiência de co-inoculação em ratinhos que produzissem quantidades reduzidas de muco.

Por outro lado, os resultados obtidos podem ser explicados de uma forma diferente. Vários géneros de bactérias que têm como habitat o intestino de mamíferos, tais como *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* ou *Bifidobacterium*, possuem o gene *luxS*, como se pode ver na FIGURA 3A (Conway *et al.*, 2004; Vendeville

et al., 2005). Na verdade, as bactérias que fazem parte destes géneros, exceptuando *Bifidobacterium* spp., pertencem à divisão *Firmicutes*, que é uma das duas divisões mais representadas na comunidade bacteriana do intestino de mamíferos (Ley *et al.*, 2006). Assim, se estas bactérias produzirem AI-2 no interior do intestino, e se colonizarem nichos onde também se encontram bactérias da espécie *E. coli*, podem complementar a não produção de AI-2 por parte das bactérias *E. coli* mutantes que foram inoculadas. Neste caso, os resultados obtidos para o Grupo 2 seriam iguais aos dos restantes grupos por causa da existência de complementação, e não porque a capacidade de produzir AI-2 não trouxesse qualquer vantagem adaptativa. Para avaliar se esta complementação existe, seria necessário verificar primeiro se as espécies referidas que possuem o gene *luxS* produzem o sinal AI-2 no interior do intestino, e, em caso afirmativo, se os níveis produzidos são suficientes para complementar as estirpes mutantes. Uma experiência que poderia revelar se a presença de outras espécies na flora intestinal de ratinhos influencia ou não a *fitness* das estirpes de *E. coli* utilizadas consistiria na repetição da experiência de co-colonização em ratinhos axénicos. A tecnologia necessária para manter ratinhos isentos de bactérias em câmaras estéreis e realizar experiências de colonização intestinal com apenas determinadas espécies já foi desenvolvida, e pode ser utilizada (Falk *et al.*, 1998). Por outro lado, também seria importante que a experiência de co-colonização fosse repetida utilizando estirpes com deleções dos genes *lsrK* ou *lsrCDBA*. Nestes casos, a mutação faz com que a estirpe de *E. coli* não responda ao sinal AI-2, sendo possível avaliar a influência do processo de comunicação durante o processo de colonização.

Tendo em conta as hipóteses que foram levantadas para explicar os resultados obtidos, concluiu-se que são precisos mais estudos para compreender se o sistema biossensor de quórum via AI-2 tem um papel importante na colonização do intestino de mamíferos.

Considerações finais

Os resultados obtidos no presente trabalho de investigação não suportam a hipótese inicialmente proposta de que a capacidade para sintetizar AI-2 é uma característica que confere uma vantagem adaptativa a bactérias da espécie *E. coli* durante a colonização do intestino de ratinhos. Apesar da conclusão obtida contrariar a hipótese inicial, será necessário realizar mais estudos para esclarecer o papel do sistema de detecção de quórum via AI-2 em *E. coli*, durante a colonização do ambiente intestinal de mamíferos. Contudo, mesmo que a conclusão deste estudo se venha a provar correcta, ela não significa que o sistema biossensor de quórum via AI-2 não possa ter outras funções que sejam relevantes. Antes de mais, é preciso notar que este sistema envolve vários genes que estão funcionalmente ligados, incluindo aqueles que se encontram organizados no operão *lsr* (Li *et al.*, 2007). É altamente improvável que sistemas génicos como estes, que têm uma regulação tão precisa e que envolvem vários genes, tenham evoluído em bactérias se eles não conferem alguma vantagem adaptativa para os organismos que os possuem. Quando comparados os sistemas de transdução de AI-2 de *V. harveyi* e *E. coli*, é possível notar que eles são muito diferentes ao nível dos genes que os compõem (Federle, 2009), como aqueles que codificam as proteínas que interagem com o sinal AI-2 (Miller *et al.*, 2004). Cada um destes sistemas está presente em espécies que têm ecologias diferentes: *V. harveyi* é uma bactéria marinha, enquanto que *E. coli* habita o intestino de mamíferos (Xavier e Bassler, 2005b); e, apesar de *V. harveyi* poder colonizar o ambiente gastrointestinal de alguns peixes (Austin e Zhang, 2006), as comunidades de bactérias que habitam este ambiente são muito diferentes quanto ao número e tipo de espécies quando comparadas com as que se estabelecem no intestino de ratinhos (Ley *et al.*, 2006). Ainda assim, ambas as bactérias possuem a enzima LuxS, sintetizam AI-2 e possuem sistemas de detecção e transdução deste sinal. Neste cenário, parece plausível a hipótese de que, dadas as diferenças entre os sistemas das espécies mencionadas, estes tenham aparecido de forma independente em *V. harveyi* e *E. coli*. Deste modo, é possível que os dois sistemas representem o resultado de um processo de evolução convergente. A ter existido, é plausível supor que os sistemas biossensores de AI-2 desempenhem funções importantes.

Várias espécies de bactérias patogénicas possuem o gene *luxS*. Em alguns casos, já foi mostrado que a regulação da expressão de factores de virulência é controlada por

um sistema biossensor de quórum via AI-2 (Vendeville *et al.*, 2005). Apesar de algumas estirpes patogénicas de *E. coli* possuírem um sistema biossensor de AI-2 que regula a sua virulência (Vendeville *et al.*, 2005), bactérias não patogénicas desta mesma espécie que habitam o intestino de mamíferos também possuem o sistema referido. Se a única função regulada pelos biossensores de AI-2 fosse a expressão de factores de virulência, por que razão teriam eles sido mantidos ao longo da evolução em bactérias não patogénicas? Ainda muito permanece por descobrir, mas talvez a resposta esteja nos estudos de interferência de Xavier e Bassler (2005b). A capacidade de internalização de AI-2 poderá ser importante sobretudo para impedir a sinalização de espécies patogénicas, cuja multiplicação levaria ao desequilíbrio da fisiologia intestinal. Na verdade, a espécie *E. coli* é uma das primeiras a colonizar o ambiente intestinal de mamíferos (Falk *et al.*, 1998), o que poderá ser um facto importante. É possível que, ao longo da evolução, tenham existido pressões selectivas que favoreceram recém-nascidos que eram permissivos à rápida colonização do seu intestino por estirpes não patogénicas de *E. coli*, uma vez que estas, através de mecanismos de interferência da sinalização via AI-2, podiam diminuir a probabilidade de estabelecimento de uma estirpe patogénica e o desenvolvimento de uma doença. Para testar esta hipótese, poder-se-iam colonizar ratinhos que não possuem flora intestinal com uma estirpe não patogénica de *E. coli* mutante que não consiga responder à presença do sinal AI-2 e, passados alguns dias, inocular esses animais com uma bactéria patogénica (como *V. cholerae*). Os resultados desta experiência poderiam ser comparados com os de uma experiência semelhante onde ratinhos eram previamente colonizados com uma estirpe não patogénica de *E. coli* cujo sistema biossensor de quórum se encontre funcional.

O trabalho de investigação levado a cabo pretendeu ser mais um contributo para a compreensão das possíveis funções ecológicas dos sistemas biossensores de quórum em situações de simbiose. Foram desenvolvidos e otimizados métodos para uma rápida quantificação de bactérias inoculadas e foram estabelecidos protocolos de inoculação de ratinhos que poderão ser muito úteis em estudos futuros. Por este meio, torna-se possível o estudo experimental de relações simbióticas entre procariontes e eucariontes. Espera-se que esta abordagem mais holista de questões em Biologia complemente os resultados obtidos por abordagens mais reducionistas e permita, em última análise, uma compreensão mais global e integrada dos vários aspectos que estruturam a biologia de organismos muito complexos, como é o caso dos mamíferos.

Referências bibliográficas

- Austin, B. e Zhang, X-H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43, 119-124 (2006)
- Barrios, A. F. G., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E. e Wood, T. K. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology* 188, 305-316 (2006)
- Bassler, B. L., Wright, M. e Silverman, M. R. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology* 13, 273-286 (1994)
- Bassler, B. L. e Losick, R. Bacterially speaking. *Cell* 125, 237-246 (2006)
- Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Berland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. e Shao, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1432-1434 (1997)
- Case, R. J., Labbate, M. e Kjelleberg, S. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 2, 345-349 (2008)
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Dorsselaer, A. V., Pelczer, I., Bassler, B. L. e Hughson, F. M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545-549 (2002)
- Conway, T., Krogfelt, K. A. e Cohen, P. S. Chapter 8.3.1.2, The life of commensal *Escherichia coli* in the mammalian intestine. In Böck, A., Curtiss III, R., Kaper, J. B., Karp, P. D., Neidhardt, F. C., Nyström, T., Slauch, J. M., Squires, C. L. e Ussery, D. (ed.) *EcoSal — Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* <http://www.ecosal.org> (ASM Press, Washington, DC, 2004)
- Crosnier, C., Stamatakis, D. e Lewis, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics* 7, 349-359 (2006)
- Datsenko, K. A. e Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 97, 6640-6645 (2000)
- Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M. e Relman, D. A. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in Ecology and Evolution* 21, 517-523 (2006)
- Eckburg, P. B., Bil, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E. e Relman, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638 (2005)

- Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T. e Gordon, J. I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1157-1170 (1998)
- Federle, M. J. e Bassler, B. L. Interspecies communication in bacteria. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 1291-1299 (2003)
- Federle, M. J. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. *Bacterial Sensing and Signaling* 16, 1-15 (2009)
- Giraud, A., Matic, I., Tenailon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M. e Taddei, F. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* 291, 2606-2608 (2001)
- Hastings, J. W. e Greenberg, E. P. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. *Journal of Bacteriology* 181, 2667-2668 (1999)
- Hardie, K. R. e Heurlier, K. Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. *Nature Reviews Microbiology* 6, 635-643 (2008)
- Heermann, R., Zeppenfeld, T. e Jung, K. Simple generation of site-directed point mutations in the *Escherichia coli* chromosome using Red®/ET® recombination. *Microbial Cell Factories* 7 (2008)
- Hegreness, M., Shoresh, N., Hartl, D. e Kishony, R. An equivalence principle for the incorporation of favourable mutation in asexual populations. *Science* 17, 1615-1617 (2006)
- Herzberg, M., Kaye, I. K., Peti, W. e Wood, T. K. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *Journal of Bacteriology* 188, 587-598 (2006)
- Kaper, J. B. e Sperandio, V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infection and Immunity* 73, 3197-3209 (2005)
- Keller, L. e Surette, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 4, 249-258 (2006)
- Leatham, M. P., Banerjee, S., Autieri, S. M., Mercado-Lubo, R., Conway, T. e Cohen, P. S. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infection and Immunity* 77, 2876-2886 (2009)
- Lee, K.-H. e Ruby, E. G. Effect of the squid host on the abundance and distribution of symbiotic *Vibrio fischeri* in nature. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1565-1571 (1994)
- Lenski, R. E. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology* 1, 265-270 (1998)
- Ley, R. E., Peterson, D. A. e Gordon, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124,837-848 (2006)

- Li, J., Attila, C., Wang, L., Wood, T. K., Valdes, J. J. e Bentley, W. E. Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* 189, 6011-6020 (2007)
- Macpherson, A. J. e Harris, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology* 4,478-485 (2004)
- Madigan, M. e Martinko, J. Microorganisms and microbiology. *In Brock Biology of Microorganisms* 9-20 (Pearson Higher Education, New Jersey, 2006)
- Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K. e Bassler, B. L. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* 110, 303-314 (2002)
- Miller, S. T., Xavier, K. B., Campagna, S. R., Taga, M. E., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L. e Hughson, F. M. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Molecular Cell* 15 677-687 (2004)
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R. e Latorre, A. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Reviews Genetics* 9, 218-229 (2008)
- Nyholm, S. V. e McFall-Ngai, M. J. The winnowing: establishing the squid-*Vibrio* symbiosis. *Nature Reviews Microbiology* 2, 632-642 (2004)
- Pereira, C. S., McAuley, J. R., Taga, M. E., Xavier, K. B. e Miller, S. T. *Sinorhizobium meliloti*, a bacterium lacking the autoinducer-2 (AI-2) synthase, responds to AI-2 supplied by other bacteria. *Molecular Microbiology* 70, 1223-1275 (2008)
- Peters, J. E., Thate, T. E. e Craig, N. L. Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *Journal of Bacteriology* 185, 2017-2021 (2003)
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Vazaneh, F., Edberg, S. e Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-241 (2004)
- Round, J. L. e Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9, 313-323 (2009)
- Shapiro, J. A., Dworkin, M. Preface. Multiculturalism versus the single microbe. *In Bacteria as Multicellular Organisms* v-13 (Oxford University Press, New York, 1997)
- Sherwood, L. The digestive system. *In Human Physiology: From Cells to Systems* 579-631 (Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007)
- Sonnenburg, J. L., Angenent, L. T. e Gordon, J. I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nature Immunology* 5, 569-573 (2004)
- Stainier, D. R. No organ left behind: tales of gut development and evolution. *Science* 307, 1902-1904 (2005)

- Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V. e Gordon, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS* 99, 15451-15455 (2002)
- Straight, P. D. e Kolter, R. Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annual Review of Microbiology* 63, 99-118 (2009)
- Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C. M. e Hardie, K. R. Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3, 383-396 (2005)
- Waters, C. M. e Bassler, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 319-346 (2005)
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. e Wiebe, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. *PNAS* 95, 6578-6583 (1998)
- Winans, S. C. e Bassler, B. L. Mob psychology. *Journal of Bacteriology* 184, 873-883 (2002)
- Xavier, K. B. e Bassler, B. L. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology* 6, 191-197 (2003)
- Xavier, K. B. e Bassler, B. L. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187, 238-248 (2005a)
- Xavier, K. B. e Bassler, B. L. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature* 437, 750-753 (2005b)
- Xavier, K. B., Miller, S. T., Lu, W., Kim, J. H., Rabinowitz, J., Pelczar, I., Semmelhack, M. F. e Bassler, B. L. Phosphorylation and processing of the quorum-sensing molecule autoinducer-2 in enteric bacteria *ACS Chemical Biology* 2, 128-136 (2007)

Anexos

Quadros suplementares

QUADRO 1A | Evolução do peso de ratinhos após tratamento de estreptomicina.

Dez ratinhos foram mantidos em condições convencionais SPF e separados em dois grupos. O antibiótico estreptomicina foi adicionado à água administrada a um destes grupos. Os pesos encontram-se registados em gramas.

Grupo	Água administrada	Ratinho	Dias após a adição de estreptomicina				
			-1	0	1	2	5
1	sem estreptomicina	1	16,2	16,7	16,9	16,7	18,1
		2	18,3	18,6	19,6	19,1	20,0
		3	17,5	17,5	17,4	17,3	18,1
		4	16,0	16,2	16,3	16,5	17,7
		5	16,6	17,4	17,5	17,2	17,2
2	com estreptomicina	6	15,2	16,1	16,0	16,3	17,6
		7	17,5	18,0	17,9	18,1	19,4
		8	17,9	18,2	18,3	18,5	19,8
		9	16,5	17,2	17,4	17,2	18,2
		10	16,8	16,8	17,2	17,2	18,9

QUADRO 2A | Efeito do tratamento de estreptomicina na microflora de ratinhos.

Foram recolhidas amostras de fezes de ambos os grupos e, após tratamento, o seu conteúdo foi plaqueado em meio LB. Os valores referem-se ao número total de colónias por grama de fezes recolhidas.

Grupo	Água administrada	Ratinho	Dias após a adição de estreptomicina					
			0	1	2	5	7	9
1	sem estreptomicina	1	3,6 E5	1,2 E6	6,0 E5	4,5 E6	4,3 E6	8,5 E5
		2	9,2 E4	4,9 E4	4,5 E4	1,3 E5	6,2 E6	6,5 E5
		3	2,7 E5	1,5 E6	3,3 E5	4,3 E5	8,0 E5	9,5 E5
		4	3,6 E5	1,9 E5	1,3 E5	6,3 E4	2,0 E6	3,0 E6
		5	1,2 E6	3,2 E5	1,3 E5	1,2 E5	1,4 E6	4,6 E5
2	com estreptomicina	6	7,7 E5	0	7,7 E2	6,6 E2	5,4 E2	0
		7	5,3 E6	4,9 E2	1,7 E3	2,0 E3	4,4 E2	0
		8	5,5 E5	0	6,0 E2	5,6 E2	0	0
		9	4,3 E5	0	0	0	0	0
		10	1,1 E6	1,2 E3	3,1 E2	3,5 E2	7,0 E2	1,9 E4

Legenda | E: expoente de base 10

QUADRO 3A | Verificação da colonização do ambiente intestinal de ratinhos com a estirpe DM006. Os ratinhos #6 a #10 foram submetidos a um tratamento de estreptomicina. As fezes de todos os ratinhos foram recolhidas em vários dias, processadas e plaqueadas em meio selectivo com ampicilina e estreptomicina sem serem diluídas previamente. Os valores referem-se ao número total de colónias por grama de fezes recolhidas.

Grupo	Água administrada	Ratinho	Dias após a adição de estreptomicina				
			0	1	2	5	7
1	sem estreptomicina	1	0	0	0	1,7 E4	9,9 E3
		2	0	0	0	8,9 E3	6,8 E2
		3	0	0	0	6,0 E3	3,1 E4
		4	0	0	0	1,5 E3	0
		5	0	0	0	1,3 E4	6,5 E3
2	com estreptomicina	6	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	0
		8	0	0	0	0	0
		9	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0

Legenda | E: expoente de base 10

Figuras suplementares

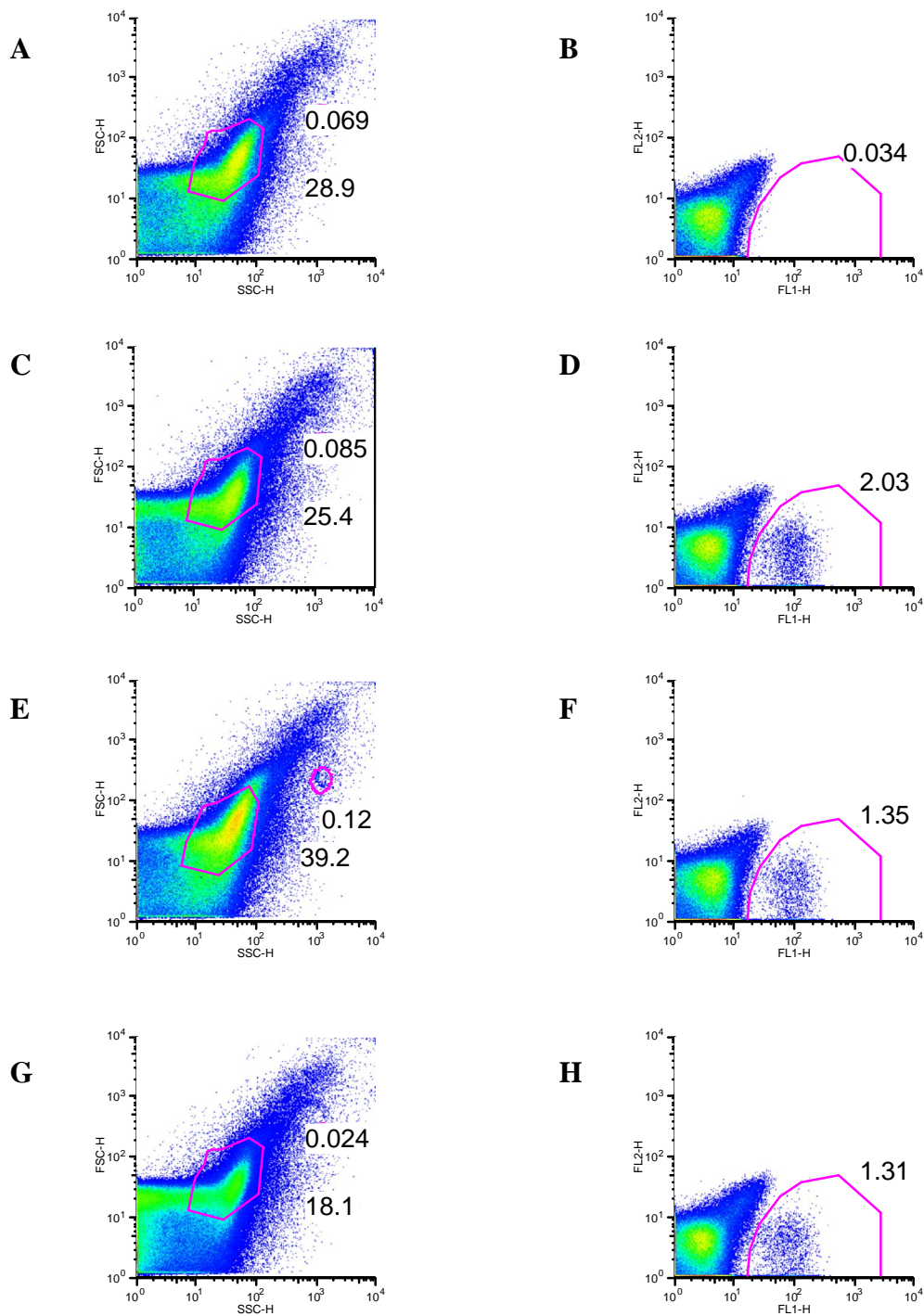


FIGURA 1A | Contagem de bactérias fluorescentes em amostras de fezes de ratinhos inoculados com a estirpe DM006. Fezes dos ratinhos #4 (grupo 1), #6, #7, #8 e #10 (grupo 2) foram colhidas 39 dias após o evento de inoculação, sendo em seguida processadas e, por fim, analisadas através de um citômetro de fluxo. As contagens realizadas nos gráficos **B**, **D**, **F** e **H** recaíram, respectivamente, sobre a população delimitada em **A**, **C**, **E** ou **G**. Cada par de gráficos refere-se à amostra #4 (**A** e **B**), #7 (**C** e **D**), #8 (**E** e **F**) ou #10 (**G** e **H**). Os valores referem-se à percentagem da população total presente em cada gráfico que se encontra dentro da região delimitada. **Legenda** | **FL1-H**: intensidade de fluorescência devida a YFP; **FL2-H**: sem significado

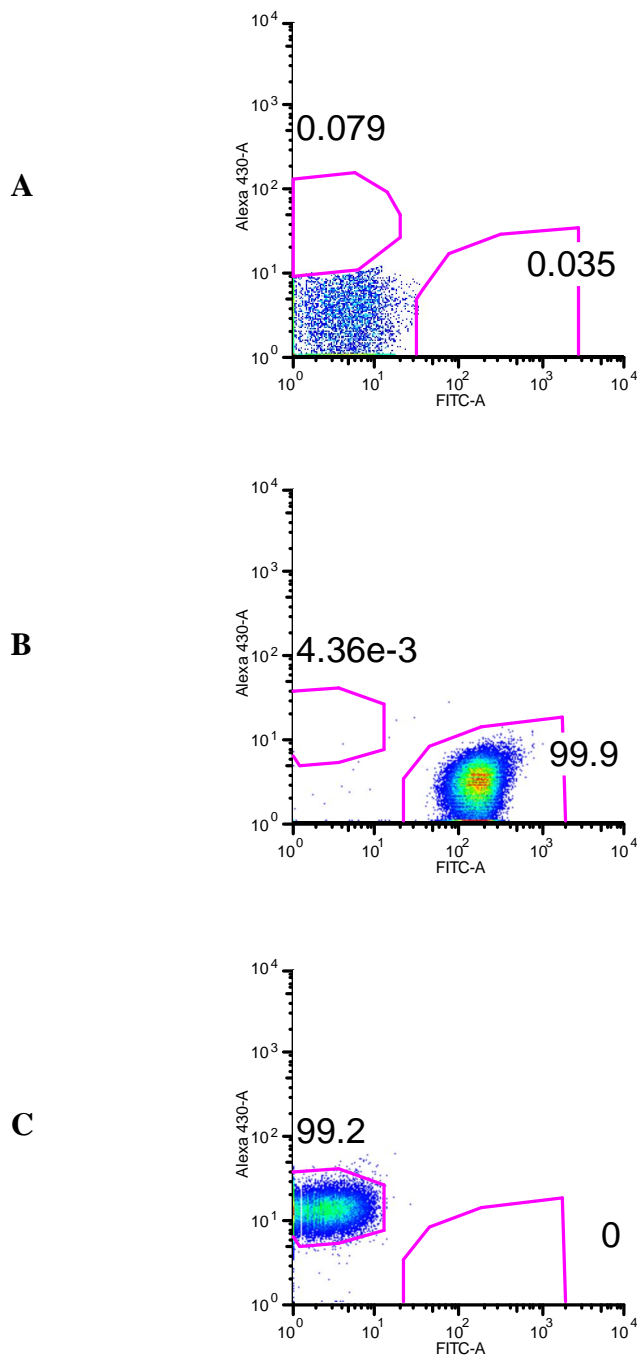


FIGURA 2A | Comparação entre a intensidade de fluorescência das estirpes DM006 e DM007. Quando bactérias da estirpe selvagem MG1655 de *E. coli* são analisadas por meio de um citômetro de fluxo, a população apresenta níveis de fluorescência muito baixos (A). Se bactérias da estirpe DM006 forem analisadas através do mesmo aparelho, a totalidade da população mostra-se fluorescente (B). Como o sinal de fluorescência é intenso, é possível separar esta população daquela que é representada em (A). Ao contrário do que acontece no caso anterior, a fluorescência das bactérias da estirpe DM007 não é tão elevada (C), o que faz com que exista uma região onde não é possível distinguir DM007 de MG1655 caso as duas estirpes se encontrem na mesma amostra. Uma situação semelhante acontece quando a estirpe DM007 está presente em amostras de fezes processadas (ver FIGURA 15-B). Verifica-se um resultado análogo para os níveis de intensidade de fluorescência de outras estirpes que produzam, à semelhança das estirpes em análise, YFP e CFP. **Legenda** | **Alexa 430-A**: intensidade de fluorescência devida a CFP; **FITC-A**: intensidade de fluorescência devida a YFP

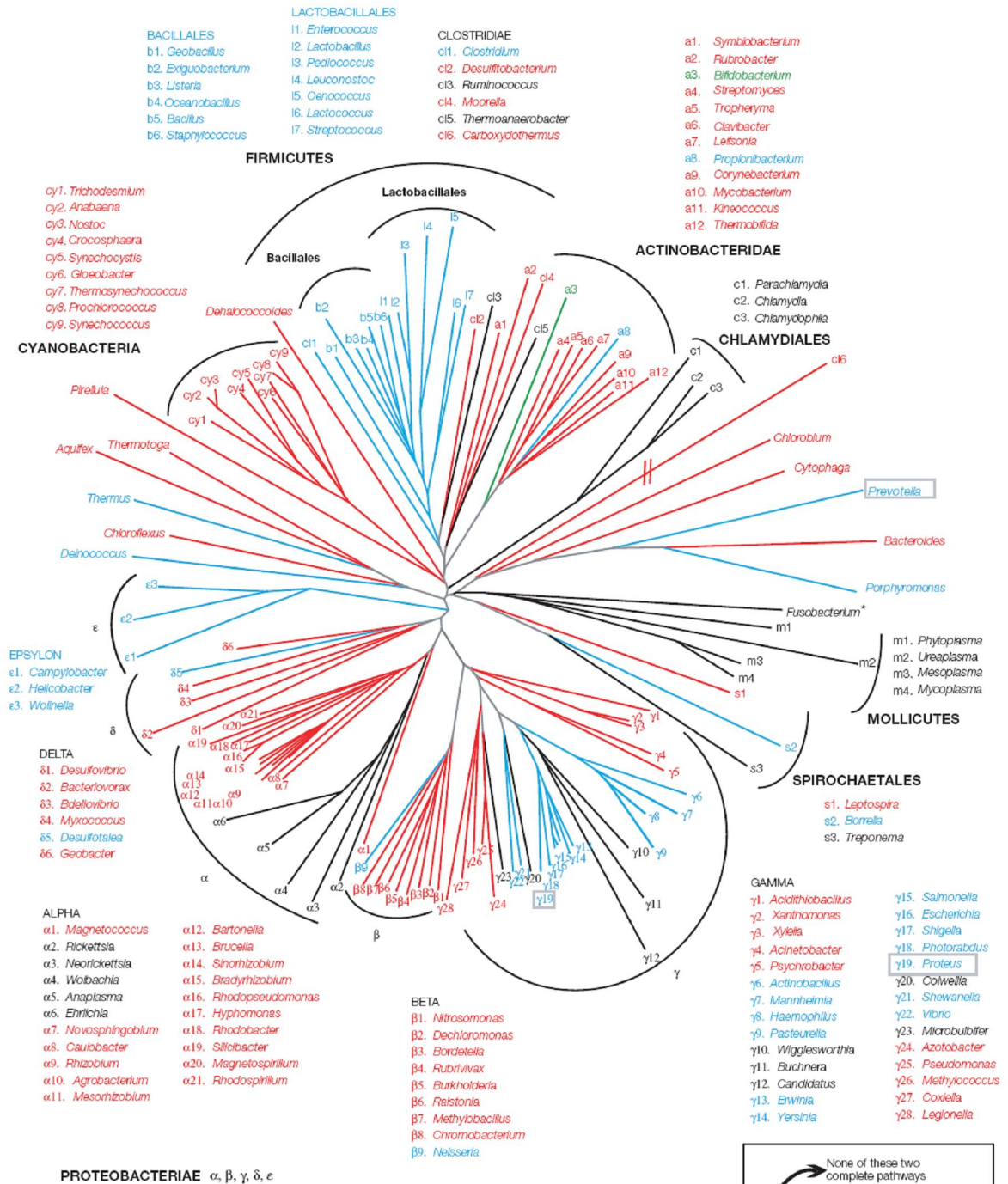


FIGURA 3A | Distribuição dos genes que codificam Pfs, LuxS e SAHh em várias espécies de bactérias. Na figura está representada uma árvore filogenética construída com base em sequências dos genes que codificam rRNA 16S provenientes de gêneros bacterianos completamente sequenciados até Outubro de 2004. Proteínas homólogas a Pfs, LuxS e SAHh foram procurados em todos os genomas utilizando as sequências de *V. harveyi* (LuxS), *E. coli* (Pfs) e *P. aeruginosa* (SAHh). **Legenda |** HCY: homocisteína; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAHh: S-adenosilhomocisteína hidrolase; SRH: S-ribosilhomocisteína

Protocolos

PROTOCOLO 1 – Armazenamento de estirpes de *E. coli*

Obter colónias individualizadas

- Inocular placa de meio LB agar apropriado com a estirpe dadora e espalhar até obter colónias individualizadas;
- Incubar a 37°C sem agitação durante cerca de 16 horas.

Crescer a estirpe a armazenar

- Seleccionar uma colónia isolada e inocular um tubo de ensaio com 5 mL de meio LB;
- Incubar a 37°C com agitação durante cerca de 16 horas.

Armazenar a estirpe-alvo

- Adicionar a um tubo de armazenamento de estirpes a baixas temperaturas 1,5 mL da cultura da estirpe-alvo previamente incubada e 150µL de dimetilsulfóxido (DMSO);
- Selar com tampa, homogeneizar e armazenar em câmara a -80°C.

PROCOLO 2 – Delecção de genes de *E. coli* segundo o método de Datsenko e Wanner (2000)

Procedimento preliminar

- Construir e encomendar iniciadores de PCR para a reacção de amplificação do gene de resistência a cloranfenicol (**nota:** as extremidades 5' dos iniciadores têm de possuir uma região de pelo menos 50 nucleótidos que seja homóloga às regiões flanqueantes do gene a excisar).

Crescer estirpe que possui plasmídeo com marcador de resistência

- Inocular um tubo de ensaio com 5 mL de meio LB com cloranfenicol (25 mg/L) com uma estirpe que possua o plasmídeo pKD3;
- Incubar a 37°C sem agitação durante cerca de 16 horas.

Extracção do plasmídeo com marcador de resistência

- Extrair plasmídeos pKD3 da estirpe-alvo utilizando um *kit*.

Amplificação do marcador da delecção

- Diluir 1:10 a amostra de plasmídeos pKD3 extraídos em água MiliQ;
- Preparar a mistura de PCR (volume total: 50µL) em quatro tubos de PCR, tendo em conta que cada tubo deve conter:
 - 34,25µL de água MiliQ;
 - 5µL de solução-tampão de PCR (10x);
 - 8µL de dNTP (concentração: 1,25mM);
 - 1µL de cada iniciador de PCR;
 - 0,5µL da mistura que contém plasmídeos pKD3;
 - 0,25µL de polimerase Taq.
- Realizar a reacção de PCR com os seguintes parâmetros:
 - Início: 95°C durante 5 minutos;
 - 30 ciclos de amplificação: 94°C durante 30 segundos (desnaturação); 55°C durante 30 segundos (ligaçao do iniciador); 72°C durante 1,5 minutos (amplificação da sequência);
 - Fim: 72°C durante 5 minutos.

Verificação da amplificação (electroforese em gel de agarose)

- Preparar uma solução de agarose de concentração 1g/100mL diluindo a agarose em pó em tampão TAE;
- Aquecer o preparado no microondas até que a agarose esteja completamente dissolvida;
- Esperar alguns minutos até que a mistura arrefeça sem solidificar;
- Retirar cerca de 50mL da mistura para um erlenmeyer e adicionar 2μL de uma solução de brometo de etídeo;
- Verter a mistura para um suporte de géis e colocar um pente para que se formem poços;
- Após solidificação, retirar o pente e colocar o gel preparado numa tina de electroforese;
- Verter tampão TAE para a tina de electroforese até o gel ficar coberto;
- Inserir nos poços o conteúdo a analisar:
 - DNA marcador: adicionar 6μL de uma solução previamente preparada de DNA marcador (contendo 80μL de tampão TE pH = 8, 20μL de tampão de electroforese, e 20μL de DNA marcador 1Kb);
 - Amostra(s): adicionar 5μL de água MiliQ, 2μL de tampão de electroforese e 5μL de produto de PCR.
- Realizar a electroforese a 80 V durante cerca de 50 minutos;
- Depois de realizada a electroforese, visualizar o gel num transiluminador e tirar fotografia.

Purificação dos produtos obtidos a partir da reacção de PCR

- Purificar os fragmentos de DNA amplificados com um *kit* apropriado;
- Realizar uma incubação com a enzima DpnI para eliminar plasmídeos que serviram de molde à reacção de PCR, adicionando a cada 50μL de volume de reacção de PCR:
 - 5μL de NEBuffer4 (10x);
 - 1μL de enzima DpnI.
- Incubar durante cerca de 16 horas;
- Juntar os produtos de PCR correspondentes às bandas que são mais intensas;
- Concentrar a amostra.

Verificação da quantidade de produto a electroporar

- Realizar uma electroforese em gel de agarose a 1% conforme instruções acima indicadas;
- Confirmar se as bandas obtidas são muito intensas através de transiluminador (**nota**: se ainda não forem, juntar todos os produtos obtidos através do PCR e purificados);
- Determinar a concentração a que o produto de PCR obtido e purificado se encontra através de um aparelho quantificador (**nota**: a amostra deve estar muito concentrada para que o rendimento da electroporação seja máximo).

Induzir o estado de competência nas células a electroporar

- Inocular previamente a estirpe receptora KX1086 num tubo de ensaio com 5 mL de meio LB com ampicilina (100 mg/L) e incubar a 30°C com agitação durante cerca de 16 horas;
- Adicionar a um erlenmeyer de 1L:
 - 200 mL de solução SOB;
 - 200µL de uma solução de arabinose de concentração 1M;
 - 200µL de ampicilina à concentração de 100 mg/mL;
 - 2 mL da estirpe KX1086 previamente crescida.
- Incubar o erlenmeyer a 30°C com agitação até que a densidade óptica esteja entre 0,6 e 0,8 (esperar entre 2h a 3h);
- Arrefecer o conteúdo do erlenmeyer durante cerca de 20 minutos;
- Centrifugar todo o conteúdo do erlenmeyer a 7000 rotações por minuto (rpm) e a uma temperatura de 4°C durante 10 minutos;
- Descartar o líquido e homogeneizar o sedimento em 200 mL de uma solução de glicerol a 10% utilizando uma pipeta;
- Centrifugar novamente nas condições indicadas;
- Descartar o líquido e homogeneizar novamente nas condições indicadas;
- Centrifugar novamente nas condições indicadas;
- Descartar o líquido e homogeneizar novamente nas condições indicadas;
- Centrifugar novamente nas condições indicadas;
- Descartar o líquido e homogeneizar o sedimento no volume de glicerol remanescente;

Electroporar o gene de resistência a cloranfenicol

- Colocar cuvettes de electroporação em gelo;
- Adicionar 50µL da suspensão da estirpe KX1086 resultante do tratamento anterior a vários eppendorfs que se encontrem em gelo;
- Adicionar 1µL, 2µL ou 5µL da mistura que contém o gene de resistência a cloranfenicol ampliado e purificado previamente a um dos eppendorfs,
- Adicionar o conteúdo de cada eppendorf a uma cuvette de electroporação e homogeneizar;
- Electroporar nas seguintes condições: 200 Ω, 25µF e 2,5 V;
- Após electroporação, adicionar imediatamente 1 mL de meio SOB com 0,4% de glucose à cuvette de electroporação e transferir todo o conteúdo para um eppendorf;
- Incubar a 37°C sem agitação durante pelo menos 1,5h.

Plaquear células electroporadas

- Transferir 500µL da suspensão celular incubada para um eppendorf e centrifugar a 10000 rpm durante 2 minutos;
- Descartar 400µL do sobrenadante e plaquear os restantes 100µL em placas com meio LB agar e cloranfenicol (25 mg/L);
- Incubar as placas a 37°C sem agitação durante cerca de 16h;
- Manter os restantes 500µL da suspensão celular electroporada à temperatura ambiente na bancada e, caso não haja crescimento nas placas que estão na incubadora, repetir o procedimento para plaquear células com a restante amostra electroporada.

Eliminar o plasmídeo auxiliar pKD20

- Seleccionar algumas colónias resistentes a cloranfenicol que foram previamente incubadas e inocular e espalhar cada uma em placas com meio LB agar e cloranfenicol (à concentração de 25 mg/mL) e em placas com meio LB agar e ampicilina (100 mg/L);
- Incubar a 37°C as placas com cloranfenicol, e a 30°C as placas com ampicilina (ambas sem agitação) durante cerca de 16h;
- Após o período de incubação, verificar se houve crescimento nas placas com cloranfenicol e se não houve crescimento nas placas com ampicilina. Em caso afirmativo, seleccionar uma colónia da placa com cloranfenicol e armazenar (ver PROTOCOLO 1). Em caso negativo, repetir o procedimento anterior até que ambas as condições se verifiquem.

Confirmação da deleção do gene-alvo

- Seleccionar uma colónia isolada e inocular um tubo de PCR previamente preparado para a reacção de amplificação, como já foi indicado anteriormente, com uma parte da referida colónia (**nota:** construir e encomendar previamente iniciadores de PCR adequados à reacção de amplificação da sequência remanescente após recombinação);
- Proceder de acordo com o que foi mencionado na amplificação do marcador de deleção;
- Confirmar a ocorrência de recombinação realizando uma electroforese em gel de agarose conforme indicado e, após visualização do gel, conferir o tamanho da sequência amplificada com o tamanho esperado após a recombinação.

PROTOCOLO 3 – Excisão de gene flanqueado por sequências FRT

Crescer estirpe que possui a deleção

- Inocular um tubo de ensaio com 5 mL de meio LB e cloranfenicol (25 mg/L) com a estirpe que possui a deleção;
- Incubar a 37°C sem agitação durante cerca de 16 horas.

Induzir o estado de competência em células da estirpe que possui a deleção

- Proceder como no PROTOCOLO 2 e adicionar a um erlenmeyer de 1L os reagentes que estão indicados, com a exceção da estirpe (que deverá ser aquela que possui a deleção);
- Proceder exactamente como no PROTOCOLO 2 até obter uma suspensão de células que possuem a deleção muito concentrada;
- Armazenar as células competentes no congelador ou em gelo seco até serem utilizadas.

Extrair o plasmídeo a electroporar

- Inocular previamente uma estirpe que possua o plasmídeo pCP20 num tubo de ensaio com 5mL de meio LB com ampicilina (100 mg/L) e incubar a 30°C com agitação durante cerca de 16 horas;
- Extrair plasmídeos pCP20 utilizando um *kit*.

Electroporar o plasmídeo de excisão

- Proceder como no PROTOCOLO 2, mas apenas adicionando 1µL de plasmídeo pCP20 extraído durante a reacção de electroporação;
- Após a electroporação, proceder como no PROTOCOLO 2, mas, no final, incubar a 30°C durante 1h.

Plaquear células electroporadas

- Plaquear 100µL do volume incubado em placas com meio LB agar e ampicilina (100mg/L);
- Incubar as placas a 30°C sem agitação durante cerca de 16h.

Eliminar o plasmídeo de excisão

- Seleccionar uma colónia resistente a ampicilina de entre que cresceram em placa e inoculá-la e espalhá-la numa placa com meio LB agar;
- Incubar a 42°C sem agitação durante cerca de 16h;

- Seleccionar uma colónia de entre que cresceram em placa e inoculá-la e espalhá-la numa placa com meio LB agar e ampicilina (100 mg/L);
- Incubar a 30°C sem agitação durante cerca de 16h;
- Após o período de incubação, verificar se não houve crescimento na placa com ampicilina. Em caso afirmativo, seleccionar uma colónia desta placa e armazenar (ver PROTOCOLO 1). Em caso negativo, repetir o crescimento em placas com LB agar nas condições referidas e voltar a crescer uma colónia desta placa noutra com meio LB agar e ampicilina (100mg/L). Nenhuma colónia deverá crescer, indicando a perda do plasmídeo.

PROTOCOLO 4 – Preparação de lisado com bacteriófagos P1

Obter colónias individualizadas

- Inocular placa de meio LB agar com a estirpe dadora e espalhar até obter colónias individualizadas;
- Incubar a 37°C sem agitação durante cerca de 16 horas.

Crescer a estirpe a utilizar

- Seleccionar uma colónia isolada e inocular um tubo de ensaio com 5 mL de meio LB;
- Incubar a 30°C com agitação durante cerca de 16 horas.

Preparar o lisado com bacteriófagos P1

- Inocular 100µL da cultura previamente incubada em dois tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB com 0,2% de glucose e 5 mM de CaCl₂. Preparar também um tubo de ensaio com o mesmo meio para servir de controlo negativo;
- Incubar os tubos de ensaio durante 30 minutos numa incubadora a 30°C com agitação;
- Adicionar 100µL de lisado que possua bacteriófagos P1 a um dos tubos de ensaio que foram inoculados com a cultura e ao tubo que só tem meio. O tubo restante funciona como controlo negativo (**nota**: pipetar bacteriófagos utilizando sempre pontas com filtro);
- Incubar os tubos de ensaio numa incubadora a 37°C com agitação até que as células do tubo que foi inoculado com bacteriófagos comecem a lisar (duração: entre 2h e 3h);
- Adicionar 100µL de clorofórmio ao tubo em que está a decorrer a infecção e homogeneizar;
- Transferir para eppendorfs o conteúdo do tubo. Centrifugar a 4500g durante 10 minutos;
- Transferir o sobrenadante cuidadosamente para um tubo de vidro;
- Adicionar 100µL de clorofórmio a cada tubo de vidro e homogeneizar;
- Armazenar a 4°C não expondo à luz.

PROTOCOLO 5 – Transdução com bacteriófagos P1

Obter colónias individualizadas

- Inocular placa de meio LB agar com as estirpes receptoras e espalhar até obter colónias individualizadas;
- Incubar a 37°C sem agitação durante cerca de 16 horas.

Crescer a estirpe a utilizar

- Seleccionar uma colónia isolada de cada estirpe receptora e inocular tubos de ensaio correspondentes contendo 5 mL de meio LB com 10mM de MgSO₄ e 5mM de CaCl₂;
- Incubar a 30°C com agitação durante cerca de 16 horas.

Realizar a transdução

- Diluir o lisado fágico 1:10 em água destilada (**nota:** pipetar bacteriófagos utilizando sempre pontas com filtro);
- Preparar tubos de controlos e tubos manipulados:
 - Tubos manipulados: adicionar 0,1 mL do lisado fágico diluído a 0,1 mL da cultura de estirpe receptora;
 - Tubos de controlo (bacteriófagos): adicionar 0,1 mL do lisado fágico diluído a 0,1 mL de meio LB com 10mM de MgSO₄ e 5mM de CaCl₂;
 - Tubos de controlo (estirpes receptoras): 0,1 mL da cultura de estirpe receptora;
- Incubar os tubos durante 20 minutos em banho-maria a 37°C;
- Adicionar 400µL de meio LB com 50 mM de citrato a cada tubo;
- Incubar em banho-maria durante 1h30 a 37°C;
- Transferir o conteúdo dos tubos de controlo contendo as estirpes receptoras e dos tubos manipulados para eppendorfs;
- Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos, descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 400µL de tampão citrato a 0,1 M, pH = 5,5;
- Plaquear 200µL em meio LB agar selectivo e incubar a 37°C sem agitação.

Purificar os transdutantes obtidos

- Seleccionar duas colónias de cada placa de transdutantes e espalhar numa placa de meio LB agar selectivo apropriado para obter colónias individualizadas. Incubar a 37°C sem agitação durante cerca de 16h;
- Repetir o procedimento anterior seleccionando apenas uma colónia de cada placa.