

MARIA EMILENE MARTINO CAMPOS-GALVÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE
SINALIZAÇÃO POR *QUORUM SENSING* EM
Salmonella enterica sorovar Enteritidis**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C198c
2012

Campos-Galvão, Maria Emilene Martino, 1983-
Caracterização do mecanismo de sinalização por *quorum
sensing* em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis / Maria
Emilene Martino Campos-Galvão. – Viçosa, MG, 2012.
78f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Salmonella enterica*. 2. Comunicação celular.
3. Biofilmes. 4. Alimentos - Microbiologia. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.344

MARIA EMILENE MARTINO CAMPOS-GALVÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE
SINALIZAÇÃO POR *QUORUM SENSING* EM
Salmonella enterica sorovar Enteritidis**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de Junho de 2012.

Elza Fernandes de Araújo
(Coorientador)

Elisabete Fantuzzi

Míriam Teresinha dos Santos

Uelinton Manoel Pinto

Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

Aos meus maiores amores,
Meus pais Emilio e Maria José
Meu marido Márcio

MAIS UMA VEZ, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido o dom do aprendizado e por colocar em meu caminho grandes oportunidades e, principalmente, por me permitir várias conquistas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela excelente estrutura e por oportunizar a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, Emilio e Maria José, por me concederem a vida, pela educação, formação e retribuírem meu imenso amor.

Ao meu marido, Márcio Fiorini Galvão, grande inspiração de todos os dias, pelo companheirismo, dedicação, paciência, entusiasmo e por me tornar a cada dia uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos, Emilio e Maria Emilia e cunhados, Carolina e Lucas, grandes entusiastas de minha vitória, aos quais tenho amor incondicional.

Aos meus afilhados, Antônio, Francisco, Laura e Luisa, pequeninos que transbordam meu coração de amor e alegria.

À família Fiorini Galvão, minha família escolhida, por torcer pelo meu sucesso.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela compreensão, inteligência, ensinamentos, amizade, imprescindível para o êxito deste trabalho.

Às minhas coorientadoras professoras Andréa de Oliveira Barros Ribon e Elza Fernandes Araújo, pela atenção, ensinamentos e amizade.

Aos professores Elisabete Fantuzzi, Miriam Teresinha dos Santos e Uelinton Manoel Pinto, pela disponibilidade e sugestões.

Aos funcionários e amigos dos laboratórios pela amizade, incentivo, apoio e por tornarem mais agradáveis e alegres o desenvolvimento deste trabalho. Em especial aos amigos dos laboratórios Genética de Micro-organismos, Microbiologia de Alimentos e Microbiologia de Anaeróbios, sentirei muita saudade do bom convívio.

Ao amigo Tiago Souza Leite pela amizade e pela disponibilidade em ajudar em todos os momentos.

A todos que de alguma forma tenham colaborado e àqueles que torcem e se alegram com minhas conquistas.

Sou muitofeliz por vocês terem contribuído com minha história.

A vocês minha imensa gratidão e carinho!

BIOGRAFIA

MARIA EMILENE MARTINO CAMPOS-GALVÃO, filha de Emilio José Campos Toledo e Maria José Martino de Campos, nasceu em Viçosa - MG, em 07 de março de 1983.

Em maio de 2006, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa.

No mesmo mês, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos, defendendo dissertação em 30 de julho de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o Doutorado em Microbiologia Agrícola, na mesma área, e defendeu a tese em 25 de junho de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
CAPÍTULO 01	
Revisão: <i>Quorum sensing</i> em <i>Salmonella</i> : comunicação regulada por diferentes moléculas sinalizadoras	14
Resumo.....	14
1. <i>Quorum sensing</i>	14
2. Mecanismo de QS em <i>Salmonella</i>	17
3. Características do sistema QS	23
4. Biofilme e <i>quorum sensing</i>	26
5. Referências Bibliográficas.....	30
CAPITULO 02	
Avaliação dos genes envolvidos no sistema <i>quorum sensing</i> de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis PT4.....	36
Resumo.....	36
1. Introdução.....	36
2. Materiais e Métodos	39
Bactérias e condições de cultivo	39
Caracterização da produção de AHL	39
Efeito da adição de AHL sobre o crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4....	40
<i>Touchdown</i> PCR para amplificação dos genes de QS mediado pelos AIs 1 e 2.	41
Análises <i>in silico</i>	42

Modelo de QS mediado pelo AI-2	42
Análise filogenética do gene <i>sdiA</i> (QS mediado por AI-1)	42
3. Resultados e Discussão	43
<i>Quorum sensing</i> em <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 578	43
Análise filogenética do gene <i>sdiA</i> (QS mediado por AI-1)	50
4. Conclusão e Perspectivas	53
5. Agradecimentos	54
6. Referências Bibliográficas.....	55

CAPÍTULO 03

Autoindutor-1 de <i>quorum sensing</i> fortalece a relação entre células de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis PT4.....	58
Resumo.....	58
1. Introdução.....	59
2. Materiais e Métodos	61
Bactéria utilizada e condições de cultivo	61
Formação de biofilme	61
Observação dos biofilmes por microscopia	62
Avaliação da expressão gênica	62
Análise estatística.....	63
3. Resultados	64
Formação de biofilmes por <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4 em diferentes meios de cultura na presença de AIs-1.....	64
Efeito de AI-1 na adesão de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis PT4.....	65

Análise da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme por RT-qPCR	67
Análise da expressão de genes de virulência por RT-qPCR	69
4. Discussão	69
5. Agradecimentos	73
6. Referências Bibliográficas	74
CONCLUSÕES GERAIS	78

RESUMO

CAMPOS-GALVÃO, Maria Emilene Martino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Caracterização do mecanismo de sinalização por quorum sensing em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon e Elza Fernandes de Araújo.

Quorum sensing (QS) é um sistema de comunicação entre bactérias dependente da densidade populacional, no qual as bactérias produzem, detectam e respondem a compostos sinalizadores de baixa massa molecular, os autoindutores (AIs). *Salmonella* apresenta sistemas de QS regulados por três diferentes AIs; AI-1, AI-2 e AI-3, que têm função ainda pouco elucidada. Neste trabalho foram identificados e caracterizados os sistemas de QS mediados pelos AIs 1 e 2 no patógeno humano *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 578, isolado de carcaça de frango. As análises foram feitas *in silico* e *in vitro*. Foi acompanhado o crescimento de *Salmonella* Enteritidis na presença dos AIs-1 sintéticos, as *N*-acil homoserina lactonas (AHLs): C₆-HSL (homoserina lactona), C₈-HSL, C₁₀-HSL e C₁₂-HSL e verificou-se que esses AIs não interferiram no crescimento deste patógeno. A confirmação de que *Salmonella* Enteritidis não sintetiza AI-1 foi feita por análise em cromatografia em camada fina. A partir do genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4, previamente depositado no GenBank, foi confirmado que a regulação do QS mediado pelo AI-2 segue o modelo proposto para *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. A análise da sequência de nucleotídeos codificadora da proteína SdiA, reguladora do QS mediado pelo AI-1, demonstrou a conservação do gene *sdiA* neste sorovar. O conhecimento de fenótipos regulados pelo sistema QS pode contribuir para a elucidação de processos importantes na microbiologia de alimentos e permitir a elaboração de estratégias de controle deste patógeno. Portanto, foi avaliada a formação de biofilmes em microplaca de poliestireno por *Salmonella* na presença de AIs-1 (C₆-HSL, C₈-HSL, C₁₀-HSL e C₁₂-HSL) na concentração final de 50 nM no meio de cultivo. Foi constatado que, na presença de AIs e, em condições de cultivo em anaerobiose, *Salmonella* Enteritidis apresentou formação de biofilme mais denso e compacto em superfícies de poliestireno. A C₁₂-HSL foi, dentre as AHLs analisadas, a que apresentou maior interferência nesse fenótipo. A formação de biofilme mais intensa na presença de C₁₂-HSL em superfície de poliestireno também foi constatada por microscopia de varredura e microscopia confocal. Para comprovar a regulação do fenótipo de formação de biofilme pelo AI-1, o experimento foi repetido na presença de uma mistura de

diferentes furanonas, inibidores de QS. A redução substancial de células aderidas na presença de furanonas confirma o efeito estimulador dos AIs-1 na formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis PT4. Por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, foi comprovado que C₁₂-HSL promoveu maior expressão dos genes *lpfA*, *fimF*, *fliF* e *glgC*, de importância para a formação de biofilmes, assim como, dos genes de virulência *hilA*, *invA* e *invF*. Estes resultados evidenciam, pela primeira vez, a função da SdiA na detecção de moléculas sinais produzidas por outras bactérias gram-negativas na modulação de fenótipos importantes para a sobrevivência e virulência de *Salmonella* Enteritidis.

ABSTRACT

CAMPOS-GALVÃO, Maria Emilene Martino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. **Characterization of the signaling mechanism by quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Andréa de Oliveira Barros Ribon and Elza Fernandes de Araújo.

Quorum sensing (QS) is a population density dependent communication system where bacteria produce, detect and respond to signaling compounds of low molecular weight, called autoinducers (AI), which are released into the environment. *Salmonella* has QS systems regulated by three different AIs: AI-1, AI-2, and AI-3. In this study, we identified and characterized the QS systems mediated by AI-1 and 2 in the human pathogen *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 578, isolated from chicken carcasses. Analyzes were performed *in vitro* and *in silico*. We carried out a growth curve of *Salmonella* Enteritidis in the presence of synthetic AI-1: C₆-HSL, C₈-HSL, C₁₀-HSL and C₁₂-HSL, and we confirmed that AI-1 do not interfere in the growth. The confirmation that *Salmonella* Enteritidis is not able to synthesize AI-1 came from TLC. Analysis based on the genome of *Salmonella* Enteritidis PT4, previously deposited in the GenBank, and the described QS system for *Salmonella enterica* serovar typhimurium we proposed a model for QS regulation mediated by AI-2 for strain PT4 578. Analysis of the nucleotide sequence that encodes SdiA, the regulatory protein of QS mediated by AI-1, demonstrates the conservation of *sdiA* in this serovar. The knowledge of phenotypes regulated by QS system may contribute to elucidate important processes in food microbiology and to development control strategies for pathogenic and spoilage microorganism. Therefore we evaluated the biofilm formation by *Salmonella* on polystyrene microtiter plates in the presence of AI-1 (C₆-HSL, C₈-HSL, C₁₀-HSL and C₁₂-HSL) at final concentration of 50 nM in the culture medium. It was found that in the presence of AIs and on anaerobic conditions, *Salmonella* Enteritidis showed a higher number of cells adhered on polystyrene surfaces. Among the AHLs analyzed, C₁₂-HSL showed greater interference with this phenotype. Strong biofilm formation in the presence of C₁₂-HSL was also observed on polystyrene surface by scanning electron microscopy and confocal microscopy. We performed tests to evaluate the interference of AIs in combination. In an attempt to verify the regulation biofilm formation, by AI-1 we added a mix of furanones, which are known QS inhibitors, and a reduced number of adhered cells was observed. Using Real time polymerase chain

reaction analysis, it was found that C₁₂-HSL increased the expression of the genes *lpfA*, *fimF*, *fliF*, *glgC*, which are important for biofilm formation as well as the *hilA*, *invA* and *invF* virulence genes. These results demonstrate for the first time the function of SdiA for detection of signalling molecules produced by bacteria in the modulation of important phenotypes for the survival of *Salmonella* Enteritidis.

INTRODUÇÃO GERAL

Salmonella é um bacilo gram-negativo, não esporulado e membro da família Enterobacteriaceae reconhecido pela capacidade de causar gastroenterites ou um tipo de infecção sistêmica, denominada de febre entérica. Uma grande variedade de alimentos está relacionada como veículo deste patógeno, mas a investigação dos surtos de salmonelose aponta como fonte frequente de *Salmonella*, as aves e subprodutos, incluindo os ovos crus. A virulência e a patogenicidade de *Salmonella* estão relacionadas à capacidade adaptativa a diferentes condições ambientais. Progressos têm sido feitos na identificação de muitos dos fatores regulatórios envolvidos na resposta de patógenos a vários sinais ambientais e a expressão de muitos desses fatores é dependente da fase de crescimento e de condições fisiológicas da célula bacteriana.

Quorum sensing (QS) é um sistema de comunicação entre micro-organismos dependente da densidade populacional. Em bactérias, esse sistema é dependente da produção de compostos sinalizadores de baixa massa molecular, os autoindutores (AIs), que são liberados no ambiente. Quando uma quantidade limiar desses compostos é atingida, as bactérias respondem por meio da ativação ou repressão de certos genes. Diversos fenótipos bacterianos, incluindo muitos fatores de virulência têm sido descritos como regulados por esse sistema de comunicação.

Salmonella apresenta sistemas de QS regulados por três diferentes AIs: AI-1, AI-2 e AI-3. Os três sistemas QS de *Salmonella* têm função pouco elucidada. O sistema mediado pelo AI-1 é incompleto, pois apresenta apenas a proteína reguladora de resposta (SdiA) e isto se deve, possivelmente, a processos evolutivos. A proteína SdiA é regulada por moléculas AIs-1 sintetizadas por outras espécies bacterianas. No sistema mediado pelo AI-2, o gene *luxS* codifica a enzima que sintetiza a molécula sinal e a expressão gênica ocorre após uma cascata de sinalização envolvendo o sistema de transporte Lsr. O terceiro sistema QS encontrado em *Salmonella* é mediado pelo AI-3 que, juntamente com os hormônios epinefrina e norepinefrina, permite a comunicação entre bactérias e seus hospedeiros mamíferos. A detecção do AI-3 pelo patógeno é dada por meio de um sistema de dois componentes formados pela quinase QseC e a proteína reguladora de resposta QseB.

Dentre os fatores de virulência de muitos patógenos que são regulados por QS, destaca-se a formação de biofilmes. Os biofilmes bacterianos têm recebido atenção considerável da comunidade científica nos últimos anos, em razão da sua ubiquidade em

ambientes naturais, clínicos e industriais. Existe grande preocupação com a resistência apresentada pelas bactérias que os constituem aos agentes antimicrobianos e ao sistema de defesa de hospedeiros infectados. Na indústria de alimentos, outro fator preocupante é a possibilidade das células se transferirem do biofilme para outros sítios e de colonizarem linhas de processamento de alimentos e outras superfícies de contato, podendo afetar a qualidade e a segurança do produto final, colocando em risco a saúde dos consumidores.

Sabendo-se que *Salmonella* é uma das principais bactérias de origem alimentar causadoras de doença em humanos, relacionadas com consumo de alimentos contaminados e que a função do sistema de QS neste patógeno é pouco conhecida, torna-se relevante estabelecer a possível relação da expressão de fatores de virulência com o mecanismo de QS. A partir desse entendimento, será possível desenvolver e investir em novas tecnologias mais eficientes para garantia de segurança alimentar e em estratégias de combate ao patógeno no organismo hospedeiro. Este estudo buscou identificar e caracterizar os componentes dos sistemas QS, mediados pelos AIs 1 e 2, em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 e avaliar a interferência de AIs-1 na expressão de genes de virulência e formação de biofilme por este patógeno, em condições de anaerobiose.

CAPÍTULO 01

Revisão: *Quorum sensing* em *Salmonella*: comunicação regulada por diferentes moléculas sinalizadoras

Capítulo formatado segundo normas da revista

Current Microbiology

Resumo

Quorum sensing (QS) é um sistema de comunicação entre bactérias dependente de densidade populacional. Neste sistema, as bactérias produzem compostos sinalizadores de baixa massa molecular, os autoindutores (AI), que são liberados no ambiente. Quando uma quantidade crítica desses compostos é atingida, as bactérias detectam a presença de um número suficiente ou quorum de bactérias e respondem por meio da ativação ou repressão de certos genes. Muitos fenótipos bacterianos, incluindo fatores de virulência, têm sido descritos como regulados por esse sistema de comunicação célula-célula. *Salmonella* é uma das principais bactérias de origem alimentar causadoras de doença em humanos e, portanto, torna-se extremamente importante caracterizar indutores de fenótipos relacionados à virulência e resistência celular neste patógeno. *Salmonella* apresenta sistema QS mediado por três autoindutores: AI-1, AI-2 e AI-3. A regulação por este sistema resulta em um comportamento coletivo coordenado, importante para vencer os desafios ambientais.

1. *Quorum sensing*

Uma das características fundamentais para a adaptação dos micro-organismos é a capacidade de detectar as mudanças do meio e, conseqüentemente, modificar o comportamento para fins de sobrevivência. Quando há mudança nas condições do meio de cultivo do micro-organismo, ocorre a modificação da expressão gênica, resultando na melhor adaptação e sobrevivência [23].

Em muitas bactérias foi evidenciado que a expressão gênica é regulada por sinais denominados autoindutores (AIs) que se difundem no meio. Quando esses AIs atingem concentrações críticas no meio externo, são internalizados e induzem a expressão de genes, resultando na alteração e metabolismo celular. Geralmente, a

sinalização mediada por AIs ocorre em alta densidade populacional, pois assim, os micro-organismos agem em comunidade com ganho de vantagens para toda a população de células que mimetiza um organismo multicelular [7,21,23]. Esse sistema regulatório é denominado de *quorum sensing* (QS) [19].

As moléculas sinalizadoras de quorum podem geralmente, ser divididas em quatro categorias: (1) derivados de ácidos graxos, conhecidos como autoindutores-1 (AI-1), geralmente *N*-acil homoserinas lactonas (AHLs), usados por bactérias gram-negativas para a comunicação intraespécie [34,56] (2) furanosil borato diéster, autoindutor-2 (AI-2), produzido por bactérias gram-negativas e gram-positivas e utilizado para comunicação intra e interespécie [13,44]; (3) autoindutor-3 (AI-3), de estrutura desconhecida [52] e (4) aminoácidos e peptídeos pequenos utilizados por bactérias gram-positivas [34,58]. Dentre as moléculas sinalizadoras, três classes estão bem definidas e servem como paradigmas para a sinalização em bactérias: as AHLs, os oligopeptídeos e o AI-2 [28].

Em bactérias gram-negativas, o sistema QS pode ser dividido em três grupos e o esquema apresentado na Figura 1 resume estes diferentes mecanismos. O primeiro sistema de QS conhecido é mediado pelo AI-1 (Figura 1A), também conhecido como AHL, que foi primeiramente descrito em *Vibrio fischeri* [38]. Este sistema apresenta os componentes LuxI/LuxR, sendo LuxI a proteína sintase da molécula sinal e LuxR, a proteína receptora, reguladora de resposta. As AHLs são produzidas na fase exponencial de crescimento e difundem através da membrana da bactéria. Quando as AHLs atingem concentrações suficientemente altas no ambiente, elas são internalizadas e se ligam a LuxR que ativa a transcrição de genes alvo, como o operon *luxICDABE* requerido para bioluminescência [21].

O segundo sistema (Figura 1B), LuxPQ/LuxS, foi estudado primeiramente na bactéria luminescente *Vibrio harveyi*, patógeno de camarão [8]. Análises genéticas do circuito de QS revelaram que essa bactéria usa dois sinais autoindutores diferentes para regular a produção de luz. Nesse circuito regulatório, acredita-se que um sinal é usado para a comunicação intraespécie e, o outro, para interespécie [8].

Em *V. harveyi*, o sistema LuxI/R está ausente e a produção de luz é controlada por duas vias paralelas não-homólogas [8]. Em uma delas, o autoindutor não é uma AHL, mas um furanosil borato diéster ou AI-2 [13], cuja síntese é controlada pelo gene *luxS* e o receptor é um sensor quinase de membrana, LuxQ. O AI-2 é produzido a partir de uma S-ribosilhomocisteína (SRH), um produto da via de utilização de S-adenosilmetionina (SAM) especificamente. LuxS cliva SRH para formar homocisteína e 4,5-dihidroxi-2,3-pentadiona (DPD) e este composto por sua vez, cliva-se espontaneamente e é

rearranjado resultando no AI-2. Evidências demonstram que, ao contrário do AI-1, a estrutura do AI-2 de diferentes espécies bacterianas é idêntica [61,69]. LuxP é uma proteína periplasmática que se liga ao AI-2 e LuxQ corresponde a um sensor quinase existente na face interna da membrana plasmática que detecta o complexo LuxP-AI-2. Após o reconhecimento, LuxQ, que possui atividade quinase/fosfatase, remove o fosfato do regulador de resposta LuxO (Figura 1) [61].

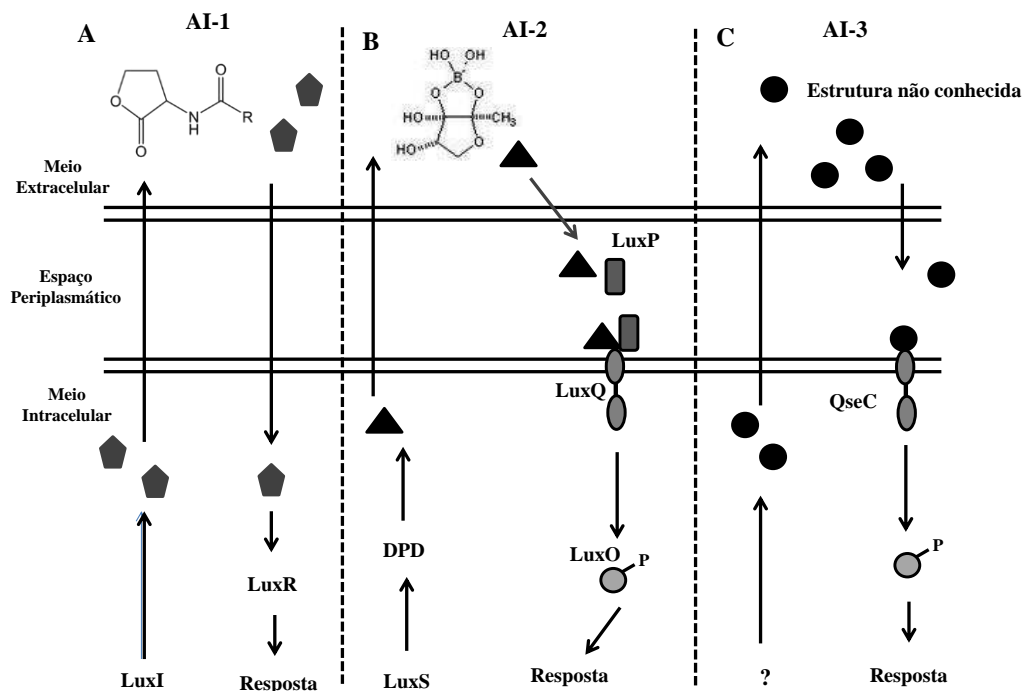


Figura 1. Estratégias de comunicação celular em bactérias gram-negativas. Fonte: Parker e Sperandio (2009) [40] com modificações. A. Estratégia mediada pelo AI-1, acil homoserina lactona. AI-1 é sintetizado por LuxI e liberado no meio extracelular. Quando AI-1 difunde para o interior celular interage com LuxR e resulta na resposta celular. B. Estratégia mediada pelo AI-2, furanosil borato diéster, sintetizado por LuxS e derivado de DPD. Furanosil borato diéster interage com LuxP no periplasma e posteriormente ocorre a cascata de fosforilação iniciada por LuxQ/LuxO. C. Estratégia mediada pelo AI-3, autoindutor de estrutura não conhecida. O AI-3 é liberado no meio, interage com QseC e esta proteína fosforila a proteína reguladora de resposta QseB.

O terceiro sistema de QS reconhecido em bactérias gram-negativas é mediado pelo AI-3 que é responsável por comunicação interespecífica (Figura 1C). A estrutura e a síntese dessa molécula sinal não são conhecidas e especula-se que pode representar uma família de moléculas como o AI-1. Parker e Sperandio (2009) [40] sugeriram que LuxS está envolvida nessa via porque não houve síntese do AI-3 em mutantes *luxS*. Entretanto, a ausência de síntese de AI-3 nos mutantes foi resultado da modificação do

metabolismo celular como oxaloacetato em vez de S-adenosilmetionina (SAM), como precursor de metionina [40].

A detecção do AI-3 pelas células bacterianas é realizada por meio de um sistema de dois componentes QseBC, onde QseC é um sensor quinase e QseB é a proteína reguladora de resposta (Figura 1). A presença do AI-3 no periplasma resulta na autofosforilação de QseC e posterior transferência do grupo fosfato para QseB que, por sua vez, ativa genes responsáveis pela biossíntese do flagelo e motilidade em *E. coli* [40]. Outra característica interessante desse sistema é que a cascata de sinalização QseBC também responde aos sinais adrenérgicos, adrenalina e noradrenalina, ambos encontrados no trato gastrointestinal. Isto sugere que QseC responde a sinais bacterianos e sinais do hospedeiro, simultaneamente. Reciprocamente, existe a possibilidade que receptores adrenérgicos de células eucarióticas possam responder ao AI-3, bem como adrenalina e noradrenalina [9,40,55].

2. Mecanismo de QS em *Salmonella*

A comunicação por QS em *Salmonella* é mais estudada em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, porém acredita-se que os diferentes sorovares também possuam os três sistemas de QS mediados pelos AIs-1, AI-2 e AI-3 [64].

O primeiro sistema QS em *Salmonella* é incompleto, pois apresenta apenas um suposto receptor, a proteína reguladora de resposta, homóloga a LuxR, e não há a síntese do AI-1 [24]. Este sistema incompleto foi inicialmente descrito em *E. coli*, onde a proteína homóloga a LuxR foi denominada de SdiA, conhecida por regular divisão celular [51]. Por meio de análises de alinhamento, Ahmer e colaboradores (1998) [2] identificaram a presença de *sdiA* no genoma de *Salmonella* Typhimurium. Neste sorovar, o gene *sdiA* encontra-se situado adjacente aos genes *yecC*, *sirA* e *uvrC* (Figura 2). Essa organização gênica é conservada em *E. coli*, *Salmonella* e espécies de *Pseudomonas* [2]. O gene *yecC* codifica a proteína YecC que se liga ao ATP no sistema de transporte ATP binding cassette (ABC) [31]. Como em *gacA* das espécies de *Pseudomonas* e *uvrY* de *E. coli*, *sirA* de *Salmonella* Typhimurium é diretamente seguido pelo gene *uvrC*, que codifica uma subunidade da enzima de reparo do DNA, UvrABC [2,31].

O fato de *E. coli* e *Salmonella* não codificarem a sintase do AI-1, sugere a possibilidade dessas bactérias sintetizarem um outro tipo de AI ou que esse grupo bacteriano apenas responda aos AIs produzidos por outras espécies bacterianas [2].

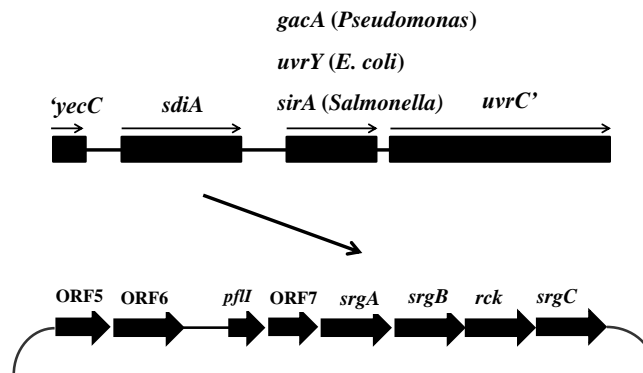


Figura 2. Organização gênica de *sdiA* e possíveis genes regulados por SdiA, presentes no plasmídeo pSLT de *Salmonella* Typhimurium.

Em *Salmonella* são reconhecidos poucos genes cuja expressão seja regulada pela proteína SdiA [58]. Os genes regulados por SdiA encontram-se no plasmídeo de virulência pSLT de *Salmonella* Typhimurium, dentre eles os genes potencialmente envolvidos na sobrevivência durante infecção em humanos, *rck*, *pefI* e o operon *srgABCDE*, cuja função ainda não foi conhecida (Figura 2) [35,58]. Por meio de análises *in silico* das sequências, as funções de alguns genes foram sugeridas, como a função de *srgA* que codifica um homólogo da proteína periplasmática dissulfeto isomerase DsbA, requerida para montagem do pilus P; *srgB* que codifica uma lipoproteína putativa, *srgC*, que codifica um suposto tipo de regulador transcricional semelhante a *araC* [35]. Acredita-se que *srgE* tenha sido adquirido por transferência horizontal com função desconhecida, porém a análise *in silico* da sequência de nucleotídeo, sugere que a proteína SrgE pode estar envolvida em sistemas de secreção tipo III [48]. A proteína SdiA é regulada por SirA, uma proteína reguladora de invasão celular, aparentemente um *housekeeping* que regula genes de virulência presentes na ilha de patogenicidade 1 (SPI-1), dentre eles, genes importantes para motilidade. Além disso, regula diretamente o operon *hil* que codifica sistema de secreção tipo I e III e CsrB, uma proteína de ligação ao RNA [48].

A atividade de SdiA em *Salmonella* Typhimurium foi detectada no intestino de tartaruga colonizada por *Aeromonas hydrophila* [52] e em camundongos colonizados por *Yersinia enterocolitica* [55]. Ambas *A. hydrophila* e *Y. enterocolitica* são patogênicas e produtoras de AIs. Nesta situação de competição, *Salmonella* Typhimurium, presente no intestino destes animais e contendo a proteína reguladora de resposta do QS, intercepta e decodifica a mensagem de competidores mediada por AI-1 para desenvolver estratégias de sobrevivência e para vencer a competição [1,55].

Entretanto, a mutação no gene *sdiA* não afetou a virulência de *Salmonella* em modelos de infecção em camundongos, aves e bovinos [43,64]. Sperandio (2010) [55] também observou que *sdiA* não confere vantagens para colonização de *Salmonella* e que SdiA não é apresenta atividade durante a infecção, porém durante co-infecção com um patógeno produtor de AHL, por exemplo, *Y. enterocolitica*, SdiA foi importante para aumentar infecção.

O segundo sistema de QS reconhecido em *Salmonella* é mediado pelo AI-2, (2R, 4SL)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahidrofurano (R-THMF), sintetizado por LuxS e derivado de DPD [62]. A concentração de AI-2 produzido por *Salmonella* depende das condições de crescimento. Quando cresce em meio rico, a concentração de AI-2 no meio aumenta, porém rapidamente o indutor é internalizado. A internalização de AI-2 é dependente de um transportador ABC nomeado de transportador Lsr. O operon *lsr* contém sete genes, *lsrACDBFGE* (Figura 3), sendo sua transcrição induzida por AI-2. Os quatro primeiros genes *lsrACDB* codificam os componentes de importação do AI-2 [61,62]. A função dos outros três genes *lsrFGE* é desconhecida, entretanto análises das sequências nucleotídicas sugerem que *lsrF* codifica uma aldolase. O gene *lsrE* é homólogo a *rpe* que codifica ribulose fosfato isomerase. O gene *lsrG* codifica uma proteína conservada de função não conhecida. As proteínas LsrF e LsrG também apresentam função de degradar o AI-2 [61,62]. O gene *lsrR* codifica um repressor transcricional e está localizado adjacente, porém, transcrito divergentemente do operon *lsr*. LsrR reprime a transcrição do operon *lsr* na ausência do AI-2 e, a presença do mesmo resulta em desrepressão. No mesmo sentido de transcrição do gene *lsrR* encontra-se o gene *lsrK*, que codifica proteína LsrK, que fosforila AI-2 [13,61,62].

Em algumas espécies bacterianas, *luxS* está relacionado a funções regulatórias, como o controle da produção de toxina em *Clostridium perfringens* [39] e da cascata de virulência em *Vibrio cholerae* [40,61], mas a verdadeira função desse autoindutor em muitas bactérias permanece obscura [31].

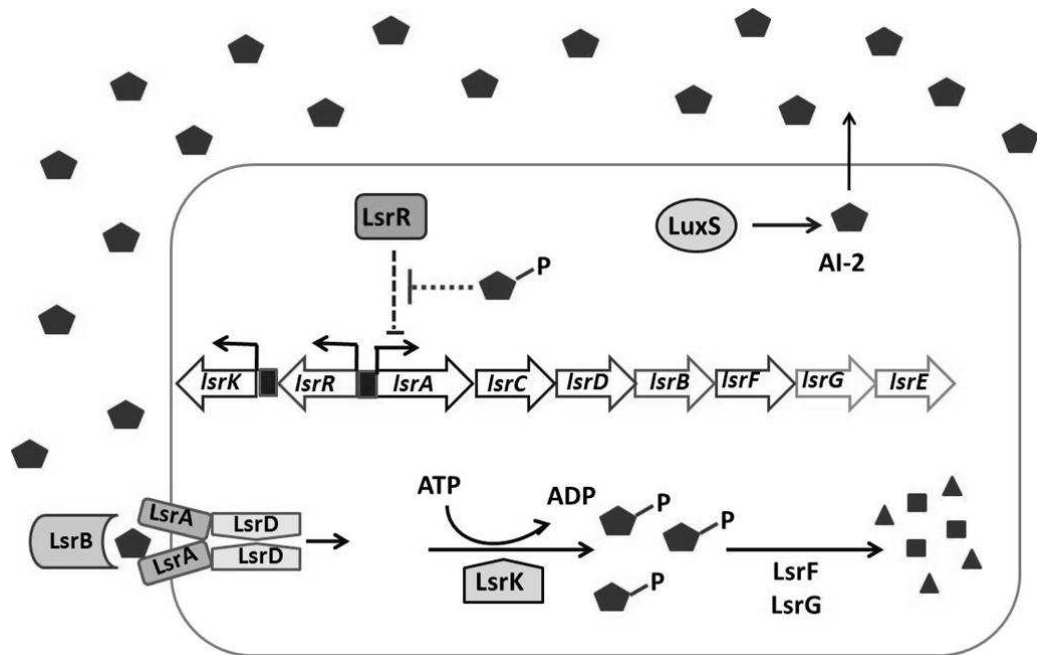


Figura 3. Modelo de regulação, transporte e modificação do AI-2 pelas proteínas LsR. Fonte: Taga et al. (2003) [61]. O AI-2 (pentágono) é sintetizado pela LuxS e acumula no meio extracelular. A expressão basal de transportadores Lsr permite que alguns AI-2 entrem no citoplasma, onde é fosforilado por LsrK. O AI-2 fosforilado induz a transcrição do operon *lsr* por meio da inativação de LsrR. Altas concentrações de AI-2 fosforilado é processado por LsrF e LsrG.

O sistema de transporte ABC, que remove AI-2 do meio e o transporta para o interior da célula, é formado por um componente protéico periplasmático que se liga ao AI-2, o LsrB. LsrK, é uma quinase que fosforila AI-2 quando entra na célula. LsrF e LsrG parecem modificar o grupamento fosfato de AI-2 (Figura 3) [12,61,62].

A proteína LuxS de *Salmonella Typhimurium* está envolvida na regulação de alguns genes presentes na SPI-1 (Ilha de Patogenicidade de *Salmonella*) [14] como *hilA* e *prgH*. Widmer e colaboradores (2007) [67] avaliaram a expressão de 1.136 genes de virulência em estirpe mutante de *luxS* e selvagem de *Salmonella Typhimurium* e observaram que 23 genes exibiram indução ou repressão significativa em amostras de carne de frango adicionadas de AI-2. Esses autores observaram que vários genes regulados positivamente codificaram proteínas citoplasmáticas ou de membrana externa, enquanto que, os genes regulados negativamente na presença de AI-2 estavam associados diretamente com a virulência bacteriana, ou seja, AI-2 regula negativamente genes de virulência. A presença do AI-2 influencia também a expressão de outros genes como *phoP*, que que codifica proteína integrante do sistema regulatório de dois componentes PhoP/PhoQ, além de regular a expressão de proteínas associadas ao transporte e metabolismo de carboidratos (*pfkA*, *gpmI* e *talB*) [54]. Widmer e

colaboradores (2012) [66] também comprovaram que a mutação no gene *luxS* reduziu a invasão de *Salmonella* Typhimurium em macrófagos, portanto diminui expressão de genes de virulência.

A análise da expressão gênica por microarranjo demonstrou que genes envolvidos na formação de biofilmes também são diferentemente expressos em *Salmonella* selvagem e mutantes em *luxS*, indicando que AI-2 pode regular esse fenótipo [27]. Estudos com mutantes *luxS* também demonstraram que muitos genes envolvidos com motilidade, incluindo *flhDC*, *motA*, *motB* e *fliN* são regulados pelo sistema QS mediado pelo AI-2 em *Salmonella* Typhimurium [64].

O terceiro sistema de QS presente em *Salmonella* é pouco esclarecido [64]. O mecanismo de regulação deste terceiro sistema é dependente da interação dos micro-organismos da microbiota intestinal e o hospedeiro. A microbiota que ajuda a manter o sistema imune auxilia na absorção de nutrientes, além de participar do desenvolvimento intestinal. Estima-se que a população microbiana gastrointestinal está em torno de 10^{14} células, excedendo ao número de células em mamíferos que é de 10^{13} [10]. Células de mamíferos, bem como de micro-organismos, comunicam umas com as outras por meio de hormônios e compostos químicos similares a hormônios e, estes sinais são detectados por patógenos bacterianos, como *Salmonella* e *E. coli* enterohemorrágica EHEC, para ativar genes de virulência, colonizar o hospedeiro e iniciar o processo da doença [64].

A sinalização deste terceiro sistema de comunicação em *Salmonella* é dada por AIs aromáticos (AI-3) produzidos pela microbiota gastrointestinal normal e por hormônios da classe catecolamina, em particular adrenalina/noradrenalina produzidos pelo hospedeiro [64]. Adrenalina e noradrenalina estão presentes no trato gastrointestinal, sendo a noradrenalina sintetizada pelos neurônios adrenérgicos presentes no sistema nervoso entérico, enquanto adrenalina é sintetizada no sistema nervoso central e glândulas supra-renais. Ambos os hormônios modulam a contração do músculo liso intestinal, fluxo de sangue submucosal e secreção de cloro e potássio no intestino [64]. Em *Salmonella* Typhimurium, o mecanismo de QS mediado pelo AI-3 apresenta características em comum com o sistema de *E. coli* que está ilustrado na figura 5 [64].

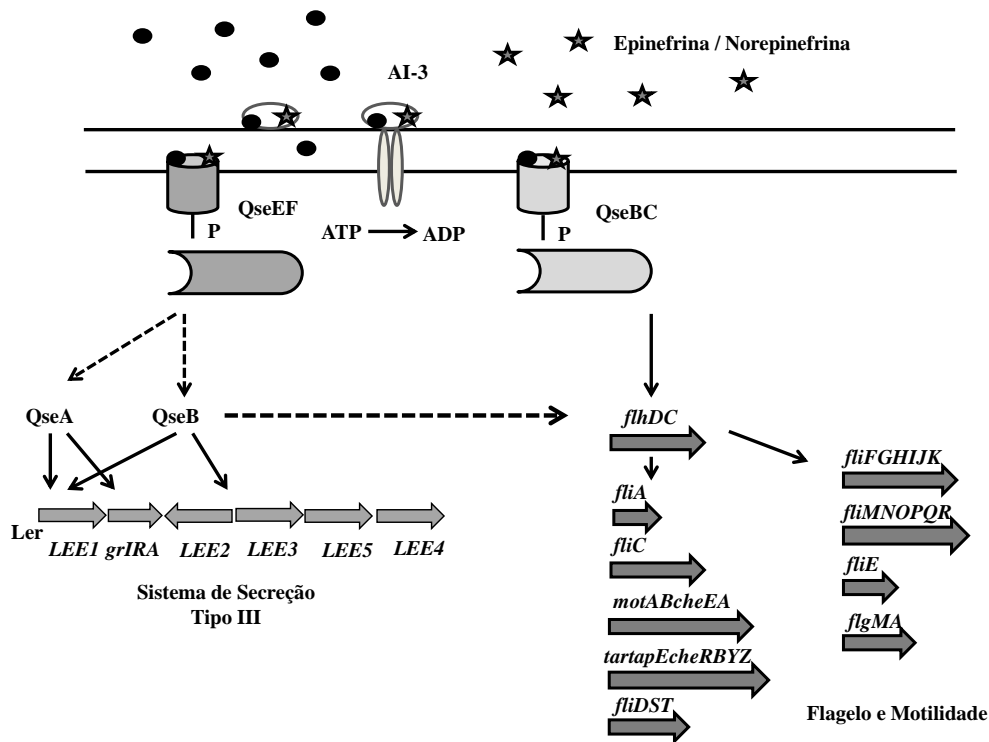


Figura 4. Modelo da cascata e sinalização de QS mediado por AI-3 em *E. coli*. AI-3 e epinefrina/norepinefrina são reconhecidos pelo mesmo receptor e interagem com o sensor quinase periplasmático. O sensor quinase QseC é parte do sistema de dois componentes QseBC e regula genes relacionados ao flagelo. Hipoteticamente, outro sistema reconhece o sinal e ativa transcrição de genes codificadores do sistema de secreção tipo III (LEE). QseA regula LEE por ativar transcrição de LEE1. Fonte: Walters e Sperandio (2006) [64].

O sistema QS mediado por AI-3 adicionalmente utiliza hormônios humanos como sinalizadores. O receptor periplasmático do sistema AI-3 foi recentemente caracterizado em *E. coli* e é conhecido como o complexo QseBC. QseC é um sensor quinase e QseB é o regulador de resposta, que ao ser fosforilado, altera a transcrição de genes de virulência [5]. O sistema AI-3 é essencial na patogênese de infecções por *E. coli* enterohemorrágica e *Salmonella Typhimurium* [5].

Salmonella Typhimurium codifica ortólogos de *qseBC* e *qseEF* de *E. coli* O157:H7 [42]. Estudos recentes indicaram que QseBC de *Salmonella Typhimurium* influencia na virulência sistêmica em camundongos, colonização em suínos e induz a motilidade por norepinefrina [42].

3. Características do sistema QS

Em muitos micro-organismos de interesse biotecnológico, a função do sistema QS é complexa e pouco esclarecida [32]. Pesquisas buscam elucidar a funcionalidade do sistema QS, porém surgem mais questionamentos do que respostas. O QS está envolvido no estabelecimento de competência, esporulação, síntese de antibióticos, indução de fatores de virulência, diferenciação celular, efluxo de nutrientes e eventos fisiológicos relacionados à infecção bacteriana. Além da sobrevivência intraespécies e diferenciação em populações bacterianas, o sistema QS também participa de relações interespecíficas entre competidores e simbioses [32].

De acordo com alguns microbiologistas, o QS evoluiu simplesmente porque permite às bactérias coordenarem o comportamento do grupo e comportarem-se como organismos multicelulares. Entretanto, o papel das moléculas sinalizadoras de QS na comunicação célula-célula é ainda questionado. Sugere-se que os autoindutores funcionem como sondas para provimento de informações sobre as propriedades do ambiente imediato para células individuais [46]. As vias de sinalização podem ter evoluído por outras razões, além da sinalização celular, ou podem ter adquirido novas funções desde que foram estabelecidas [28].

Na tentativa de compreender o alcance desse sistema de sinalização, dado o impacto do QS na patogênese bacteriana, funções diferentes da comunicação dependente da densidade populacional foram propostas para os AIs, porém nada foi comprovado. A análise das propriedades das moléculas AIs demonstram características que propiciam diferentes funções além da sinalização celular, como quelantes de ferro, antibióticos e propriedades que resultam na alteração da membrana [50]. É possível que os diferentes AIs usados como mediadores dos três sistemas QS possam apresentar uma das funções descritas anteriormente ou adquirirem modificações após serem secretados e assim, assumirem várias funções, simultaneamente. Dessa forma, certos micro-organismos tornam-se mais competitivos para sobreviverem e se adaptarem a ambientes diversos [50].

Micro-organismos requerem ferro para crescer e a aquisição do ferro é dada por sistemas transportadores mediante quelantes de alta afinidade ou sideróforos. Moléculas sinal de quinolona presentes em *Pseudomonas aeruginosa* (PQS), correspondem a AIs de QS e apresentaram função de quelante [11,16]. AI-1, AI-2 e peptídios sinalizadores são relativamente solúveis em água, quando secretados difundem livremente entre as células e sua passagem está relacionada com alteração da fluidez de membrana. Similarmente aos antibióticos, o AI-1 produzido por bactérias

gram-negativas e seu derivado ácido tetrâmico mostraram ação bactericida contra bactérias gram-positivas e, embora o modo de ação ainda não tenha sido esclarecido, sugere-se função como próton ionóforo para causar lise celular [50].

Estudos recentes questionam se o sistema QS corresponde à regulação de genes apenas quando se atinge alta densidade populacional [41,46,50]. Uma nova visão do sistema QS propõe que a difusão pode ser a chave da regulação dos processos mediados por AIs. Por exemplo, no estado de competência natural de *Bacillus* e *Streptococcus*, a capacidade de absorção do DNA é regulada por AIs e, este estado é dependente da alta densidade populacional. No entanto, AIs de *B. subtilis* também regulam funções de secreção, incluindo tensoativos e antibióticos, e o estado de competência poderia refletir sua capacidade de aumentar a disponibilidade de DNA ao invés de uma necessidade de ação em grupo. Da mesma forma, o estado de competência estimulado por AIs em *Streptococcus mutans* também estimula a formação de biofilme e a resistência a ácido, sugerindo que a absorção de DNA é parte de um conjunto de adaptações ambientais, ainda pouco compreendidas em *Streptococcus* [46,69].

Os diferentes sistemas mediados por AIs demonstram características que foram explicadas como adaptações para a comunicação, mas pode ser resultado do sensoriamento ambiental. Muitos organismos usam dois ou mais AIs diferentes, que geralmente diferem em propriedades físicas e assim, podem transmitir diferentes informações sobre o meio ambiente [46,69].

Fuqua e colaboradores, em 1994 [19], denominaram a regulação da expressão gênica em função da densidade populacional como QS, porém, o mesmo pesquisador discutiu, mais tarde, qual a melhor denominação para esse sistema, pois muitas questões ainda permanecem sem respostas e pesquisas confirmam outras funções independentes da densidade populacional [41]. Diferentes termos já foram propostos como demonstrado na Tabela 1. Isto sugere que, provavelmente, esse sistema participe de outras funções até mesmo aquelas diferentes da comunicação celular.

Uma função, além da comunicação celular, envolve o gene *luxS* que é fundamental na ciclagem do grupo metil. Essa função é essencial para o metabolismo celular e não para comunicação celular. Sendo assim, Platt e Fuqua (2010) [41] sugeriram estudos para avaliar se a interação celular é fundamental para regular fenótipos por meio do sistema QS.

Entretanto, ainda não está completamente elucidado como a comunicação celular ocorre nas bactérias. Pesquisas sobre a sinalização baseada em AHLs mostram que esse sistema é muito comum. Os tipos de moléculas potenciais que as bactérias

produzem e às quais respondem para se adaptarem em seu ambiente, incluindo ambientes competitivos, ainda são pouco exploradas e o número de moléculas sinalizadoras identificadas é crescente [29]. Embora o regulon QS tenha sido caracterizado em várias espécies de bactérias e represente até 10% do genoma em algumas espécies, sendo desconhecida função deste sistema em muitos organismos [34].

Tabela 1. Nomes propostos para diferentes fatores que influenciam na concentração de moléculas AIs de QS. Fonte: Platt e Fuqua (2010) [41].

Nomes propostos	Fatores enfatizados
	Relativo à localização espacial das células
<i>Quorum sensing</i>	Densidade populacional local
<i>Positional sensing</i>	Organização espacial das células
<i>Cluster sensing</i>	Organização espacial e distribuição das células no meio
	Processos de difusão
<i>Diffusion sensing</i>	Taxas de difusão
<i>Compartment sensing</i>	Difusão limitada devido a empecilhos físicos do meio
<i>Confinement-induced sensing</i>	Difusão limitada devido a empecilhos físicos do meio
	Posicionamento espacial de células e processos de difusão
<i>Efficiency sensing</i>	Densidade populacional local e taxas de difusão
<i>Cumulative gradient sensing</i>	Acúmulo de AI determinado pela densidade de células, taxa de produção e taxa de difusão
	Condições ambientais
<i>Diel sensing</i>	Estabilidade de AI devido a condições do pH do meio

Nas últimas décadas, muito se aprendeu sobre os mecanismos utilizados pelas bactérias para se comunicar e controlar características de virulência. Ainda assim, novas moléculas e seus efeitos sobre virulência microbiana continuam a ser descobertas. É evidente que a interface entre detecção de quorum e virulência bacteriana representa uma área promissora de pesquisas a partir da qual novas e eficazes drogas podem surgir [4].

Na maioria dos ambientes, as bactérias são encontradas em comunidades mistas e, portanto, sinais produzidos por uma dada espécie podem ser detectados por outras espécies que compartilham o mesmo nicho ecológico [4]. Moléculas sinalizadoras são importantes para fortalecer a bactéria por meio da regulação de genes que resultam em mudança no estilo de vida e aumento de virulência, desta forma, a bactéria será capaz de vencer as barreiras e competidores.

4. Biofilme e *quorum sensing*

A formação de biofilmes por *Salmonella* é uma importante estratégia de sobrevivência em diversos ambientes, induz infecções crônicas e é uma possível forma de colonizar organismos hospedeiros [25].

Os biofilmes podem ser definidos como conjuntos de micro-organismos envoltos em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, que funcionam como um consórcio cooperativo e representam a forma de vida microbiana predominante no planeta [32,68]. Essas comunidades protegem os micro-organismos em ambientes hostis e garantem o acesso aos nutrientes para a sobrevivência [20]. Fazem parte dessa definição, agregados microbianos presentes em interfaces ar-líquido, líquido-líquido e agregados flutuantes como flocos ou grânulos. Apesar de essas estruturas serem geralmente associadas a finos filmes microbianos com espessuras da ordem de micrômetros ou milímetros, alguns biofilmes podem atingir vários centímetros [68]. Pesquisas recentes sobre biofilme em habitat bem como em modelos definidos em laboratório revolucionaram a ciência da microbiologia [32].

Na maioria dos biofilmes, os micro-organismos são responsáveis por menos de 10% da massa seca, enquanto a matriz pode ser responsável por mais de 90%. A matriz extracelular é um material, geralmente produzido pelos próprios organismos, no qual as células do biofilme estão inseridas. A matriz é composta por um agregado de diferentes tipos de biopolímeros conhecidos como substâncias poliméricas extracelulares (EPS) [18,20,57].

A formação de biofilme permite um estilo de vida que é totalmente diferente do estado planctônico. Embora as interações moleculares dos vários polímeros secretados não estejam definidas, várias funções dos EPS têm sido determinadas, demonstrando vantagens para o modo de vida em biofilme. As vantagens da permanência das células bacterianas em biofilmes são numerosas, principalmente no que se refere à proteção contra agentes agressivos como sanitizantes, antibióticos, à radiação UV e a desidratação [21,57,58].

Estruturas extracelulares bacterianas, como *pili*, flagelos e fímbrias podem estabilizar a matriz extracelular, bem como as vesículas de membrana derivadas de membranas externas de bactérias gram-negativas que podem conter uma série de enzimas e DNA capazes de alterar as propriedades da matriz [57,58]. Estas vesículas muitas vezes são liberadas para inibir a formação de biofilmes de organismos concorrentes [57].

Em geral, a formação de biofilme é dividida em duas fases, inicia-se com a adesão das bactérias à superfície do substrato (fase de adesão) e continua com a proliferação e diferenciação das células aderidas (estágio de maturação). Do ponto de vista da biologia molecular, estas duas fases são controladas por adesinas de superfície e por meio de vias de sinalização da comunicação célula-célula [21].

Os biofilmes podem ser espessos, homogêneos ou podem ser constituídos de estruturas complexas em forma de pilares com canais que permitem o influxo de água e de nutrientes e o efluxo de metabólitos [13,15,32].

A formação de biofilme é um processo determinante na virulência de muitas infecções bacterianas, pois resulta em aumento significativo da resistência das bactérias aos antibióticos e às defesas do hospedeiro. A estratégia de resistência às drogas utilizadas pelas células sésseis é diferente das adotadas pelas células planctônicas. Biofilmes de patógenos têm atraído muitas pesquisas no campo da medicina e da indústria alimentícia devido aos riscos potenciais, à resistência antimicrobiana e à produção de fatores de virulência [13].

Para sobreviver a diversas condições ambientais, espécies de *Salmonella* formam biofilmes em uma variedade de superfícies bióticas, como em superfície das plantas, células epiteliais e cálculos biliares, e em superfícies abióticas, como cimento, plástico, vidro, borracha e aço inoxidável, causando graves consequências econômicas e de saúde [58]. Os sorovares de *Salmonella* são diferenciados em morfotipos de acordo com a capacidade de formação de biofilme. Assim, o morfotipo RDAR forma colônia vermelha, seca e áspera quando cultivado em meio contendo vermelho Congo e, ou películas na interface ar-líquido [58]. Estes fenótipos são caracterizados por uma matriz extracelular constituída de fímbria, celulose e exopolissacarídeos, o que resulta em sobrevivência prolongada e aumento da resistência aos antimicrobianos em ambientes dentro e fora do hospedeiro [58].

Além disso, outros componentes estruturais são importantes durante a formação do biofilme por *Salmonella*, como: *curli*, fímbrias, flagelos, celulose, ácido colânico, cápsula e ácidos graxos. Variações estruturais ocorrem em biofilmes formados em diferentes superfícies e sob diferentes condições. Portanto, a formação de biofilme é fortemente influenciada por diferentes sinais ambientais, por meio de uma rede regulatória complexa [58].

As estruturas dos biofilmes em algumas espécies variam em função de processos não-regulados pelas bactérias, como as forças físicas do fluxo. Entretanto, em outras

espécies, essas estruturas podem variar em função de processos regulados pela disponibilidade de nutrientes ou por outros mecanismos como o QS [58].

Muitos trabalhos demonstraram que a formação de biofilmes é regulada positivamente ou negativamente por sistema QS mediado pelos AIs 1 e 2. Por exemplo, foi demonstrado que os sistemas QS de *Yersinia pseudotuberculosis* [6], *A. hydrophila* [31] e *Serratia liquefaciens* [29] regulam a formação de biofilme. Foi demonstrado que o sistema QS CepI/CepR de *Burkholderia cepacia* H111 regula a etapa de maturação do biofilme [26]. Em *Staphylococcus aureus*, o gene *agr*, componente do sistema QS mediado pelo AI-1, tem efeitos variáveis sobre a formação do biofilme e, dependendo do meio e das condições de fluxo, este gene é reprimido em biofilmes, mas está ativamente expresso em população dispersa [32]. A regulação da formação de biofilme por AI-2 foi demonstrada em patógenos como *Salmonella Typhimurium* [59] e *Streptococcus mutans* [33].

Prouty e colaboradores (2002) [42] descobriram que a inativação do gene *luxS* de *Salmonella Typhimurium* resultou em biofilme com células aderidas espalhadas com pequena produção de EPS na superfície de cálculos biliares após 4 dias de incubação enquanto a estirpe selvagem apresentou biofilme mais denso. Jesudhasan e colaboradores (2010) [27] demonstraram que a inativação do gene *luxS* prejudicou a formação de biofilme em poliestireno. Análise de microarranjo revelou que muitos genes de motilidade e relacionados com biofilme foram diferencialmente expressos nas estirpes selvagem e mutante em *luxS* de *Salmonella Typhimurium* [27].

Considerando que a formação de biofilme está associada à resistência bacteriana, muitos pesquisadores vêm desenvolvendo drogas que visam inibir a formação destas estruturas por patógenos [13,18]. Muitos desses inibidores são produzidos por outros micro-organismos visto que competidores desenvolvem mecanismos para desarmar o sistema *quorum sensing* e ganhar a competição [17]. Inibidores do sistema *quorum sensing*, como enzimas capazes de hidrolisar a molécula sinal e análogos de molécula sinal foram identificados em organismos procariotos e eucariotos [17]. A utilização de antagonistas e de enzimas que degradam moléculas sinalizadoras é importante, pois, ao inibirem a cascata de transdução de sinal de *quorum sensing*, podem reduzir a expressão de fatores de virulência e o desenvolvimento de biofilmes [53]. Esses compostos que inibem o sistema *quorum sensing* constituem uma nova geração de agentes antimicrobianos com aplicações em muitos campos, incluindo medicina humana e veterinária, agricultura, segurança e deterioração de alimentos [53].

No mecanismo de interrupção do sistema *quorum sensing* moléculas antagonistas podem se ligar aos reguladores de resposta de *quorum sensing*, impedindo a ativação dos mesmos. A alga marinha vermelha *Delisea pulcha* desenvolveu mecanismo de defesa para impedir que sua superfície fosse colonizada por bactérias e produz furanonas halogenadas como antagonistas de AHLs [22]. Por apresentar estrutura similar a das AHLs, as furanonas halogenadas são capazes de se ligarem a proteína do tipo LuxR e, com isso, inibir a ativação da mesma pela AHL [44]. Givskov e colaboradores (1996) [22] verificaram que furanonas halogenadas interferem no sistema *quorum sensing* e afetaram a motilidade de *Serratia liquefaciens*. O efeito inibitório das furanonas na formação de biofilmes, mas não no crescimento de *Hafnia alvei* 071, também foi constatado por Viana e colaboradores (2009) [63].

Rasmussem e colaboradores (2005) [44] avaliaram o potencial de inibição do sistema *quorum sensing* por 53 compostos, divididos em extratos de plantas ou ervas e compostos químicos puros. Dentre as substâncias avaliadas, as mais efetivas foram o extrato de alho e o 4-Nitro-piridina-*N*-óxido. Ambos os compostos mostraram especificidade por genes de virulência regulados por *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*, por análise de microarranjo de DNA. Eles também reduziram significativamente, a tolerância do biofilme de *P. aeruginosa* ao tratamento com tobramicina, assim como a virulência *Caenorhabditis elegans*.

Compostos sintéticos também podem ter ação sobre o sistema *quorum sensing*. Segundo Riedel e colaboradores (2006) [47], antagonistas de AHLs sintetizados a partir da solução de 3-(*tert*-butil)-1-metilprazol-5 carbonil clorido, diminuíram a atividade proteolítica de *Burkholderia cenocepacia*, por meio da inibição do sistema *quorum sensing*.

Muitos trabalhos têm demonstrado que a formação de biofilme é regulada por *quorum sensing* e a partir dessa informação buscam-se estratégias para interromper esse mecanismo de comunicação em diferentes áreas, com destaque em indústria de alimentos, visando alimentos microbiologicamente seguros e com maior vida de prateleira [4,42].

5. Referências Bibliográficas

1. Ahmer BMM, Gunn J (2011) Interaction of *Salmonella* spp. with the intestinal microbiota. *Front Microbiol.* 2(101): 1-9.
2. Ahmer BMM, Reeuwijk JV, Timmers CD, Valentine PJ, Heffron F (1998) *Salmonella* Typhimurium encodes SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J Bacteriol.* 180 (5):1185-1193.
3. Ahn SK, Tahlan K, Yu Z, Nodwell J (2007) Investigation of transcription repression and small-molecule responsiveness by tetR-like transcription factor using a heterologous *Escherichia coli* based assay. *J Bacteriol.* 189 (18): 6655-6664.
4. Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Brett B (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol.* 156: 2271–2282.
5. Asad S, Opal SM (2008) Review - Bench-to-bedside review: quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Crit Care.*12 (6): 1-11.
6. Atkinson S, Troup JP, Stewart GSAB, Williams P (1999) A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol.* 33: 1267–1277.
7. Bai J, Rai R (2011) Bacterial quorum sensing and food industry. *Comp Rev Food Sci. Food Safety.* 10: 184-194.
8. Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR (1993) Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol.* 9: 773-786.
9. Bearson BL, Bearson SMD, Uthe JJ, Dowd SE, Houghton JO, Lee I, Toscano MJ, JR DCL (2008) Iron regulated genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to norepinephrine and the requirement of *fepDGC* for norepinephrine-enhanced growth. *Microb Infect.* 10: 807-816.
10. Berg RD (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4 (11):430-435.
11. Bredenbruch F, Geffers R, Nimtz M, Buer J, Haussler S (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity. *Environ Microbiol.* 8:1318–1329.
12. Byrd CM, Bentley WE (2009) Quieting cross talk – the quorum sensing regulator LsrR as a possible target for fighting bacterial infections. *Cell Res.* 19:1229-1230.

13. Chen X, Schauder S, Potier N, Van DA, Pelczer I, Bassler, BL, Hughson FM (2002) Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. *Nature*. 415:545-549.
14. Choi J, Shin D, Ryu S (2007) Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence: the *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. *Infect Imm*. 75:4885-4890.
15. Davey ME, O'toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microb Mol Rev*. 64: 847-867.
16. Diggle SP, Matthijs S, Wright VJ, Fletcher MP, Chhabra SR, Lamont IL, Kong X, Hider RC, Cornelis P, Cámara M, Williams P (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol*. 14: 87–96.
17. Dong YHE, Zhang LH (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol*. 43: 101-109.
18. Frederick MR, Kuttler C, Hense BA, Eberl HJ (2011) A mathematical model of quorum sensing-regulated EPS production in biofilm communities. *Theor Biol Med Model*. 8: 1-29.
19. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 176 (2): 269-275.
20. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 13 (1): 34-40.
21. Ganin H, Tang X, Meijler M (2009) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by AI-2 analogs. *Bioorg Med Chem Let*. 9: 3941-3944.
22. Givskov MR, de NIS R, Manefield GL, Maxmilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD, Kjerlleberg S (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. *J Bacteriol*. 178: 6618-6622.
23. Gospodarek E, Bogiel T, Zalas-Wiecek P (2009) Communication between microorganisms as a basis for production of virulence factors. *Pol J Microbiol*. 58 (3):191-198.
24. Halatsi K, Oikonomou I, Lambiri M, Mandilara G, Vatopoulos A, Kyriacou A (2006) PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. *FEMS Microbial Let*. 259: 201-207.
25. Hermans K, Nguyen TLA, Roberfroid S, Schhoofs G, Verhoven T, Coster DD, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJ (2011) Gene expression analysis of monospecies *Salmonella* Typhimurium biofilms using differential fluorescence induction. *J Microbiol Meth*. 84: 467–478.

26. Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Molin S, Eberl L (2001) The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiol.* 147: 2517-2528.
27. Jesushasan PR, Cepeda ML, Widmer K, Dowd SE, Soni KA, Hume ME, Zhu J, Pillai SD (2010) Transcriptome analysis of genes controlled by *luxS*/autoinduce-2 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis.* 7 (4): 399-410.
28. Keller L, Surette M (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol.* 4 (4): 248-258.
29. Labbate M, Queck AY, Koh KS, Givskov M, Kjeller S (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol.* 186: 692–698.
30. Lerat E, Moran NA (2004) The evolutionary history of quorum sensing systems in bacteria. *Mol Biol Evol.* 21 (5): 903-913.
31. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevit W, Dodd CER, Williams P (2002) The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol.* 4 (1): 18-28.
32. March JC, Bentley WE (2004) Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotech.* 15: 495-502.
33. McDougald D, Rice AS, Barrud N, Steinberg PD, Kjelleberg S (2011) Review: Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* 10: 39-50.
34. Merritt J, Qi F, Goodman SD, Anderson MH, Shi W (2003) Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 71: 1972–1979.
35. Michael BB, Smith J, Swift S, Heffron F, Ahmer BMM (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol.* 183:5733-5742.
36. Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Ann Rev Microbiol.* 55: 165-199.
37. Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL (2002) Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell.* 110: 303-314.
38. Nealson KH, Hastings JW (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43: 496-518.
39. Ohtani KH, Hayashi H, Shimizu T (2002) The *luxS* gene is involved in cell-cell signaling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol.* 44: 171-179.

40. Parker CT, Sperandio V (2009) Cell-to-cell signaling during pathogenesis. *Cel Microbiol.* 11(3): 363-369.
41. Platt TG, Fuqua C (2010) What's in a name? The semantics of quorum sensing. *Trends Microbiol.* 18 (9):383-387.
42. Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS (2002). Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect. Imm.* 70(5): 2640–2649.
43. Pullinger GD, Carnell SC, Sharaff FF, Diemen PMV, Dziva F, Morgan E, Lyte M, Freestone PPE, Stevens MP (2010) Norepinephrine augments *Salmonella enteric*-induced Enteritidis in a manner associated with increased net replication but independent of the putative adrenergic sensor kinase QseC and QseE. *Infect Imm.* 78 (1): 372-380.
44. Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M, Nielsen J, Eberl L, Givskov M (2005) Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol.* 187(5): 1799-1814.
45. Reading NC, Sperandio V (2006) Minireview - Quorum-sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbial Lett.* 254: 1-11.
46. Redfield RJ (2002) Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol.* 10 (8): 365-370.
47. Riedel K, Kothe M, Kramer B, Saeb W, Gotschlich A, Ammendola A, Eberl L (2006) Computer-aided design of agents that inhibit the cep quorum-sensing system of *Burkholderia cenocepacia*. *Ant Agents Chemot.* 50: 318-323.
48. Sabag-Daigle A, Soares JA, Smith JN, Elmasry ME, Ahmer BMM (2012) The acyl homoserine lactone (AHL) receptor, SdiA, of *E. coli* and *Salmonella* does not respond to indole, but at high concentrations indole can interfere with AHL detection. *Appl. Environ Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00046-12.
49. Schauder S, Bassler BL (2001) The language of bacteria. *Genes Develop.* 15: 1468-1480.
50. Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M (2009) More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Cell Press* 16:189-195.
51. Sitnikov DM, Schineller JB, Baldwin TO (1996) Control of cell division in *Escherichia coli*: Regulation of transcription of ftsQA involves both rpoS and SdiA-mediated. *PNAS.* 93 (1): 336-341.
52. Smith JL, Dysze JL, Soares JA, Ellermeier CD, Altier C, Lawhon SD, Adams LG, Konjufca V, Curtiss III R, Schlauch JM, Ahmer BMM (2008) SdiA, an *N*-acylhomoserine lactone receptor, becomes active during the transit of *Salmonella enterica* through the gastrointestinal tract of turtles. *PLOS One* 7(3): e2826.

53. Smith JL, Fratamico PM, Novak JS (2004) Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *J Food Protect.* 67 (5): 1053-1070.
54. Soni KA, Jesudhasan PR, Cepeda M, Williams B, Hume M, Russel WK, Jayaraman A, Pillai SD (2008) Autoinducer AI-2 is involved in regulating a variety of cellular processes in *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis.* 5 (2): 147-153.
55. Sperandio V (2010) Commentaries – SdiA bridges chemical signaling between *Salmonella enterica* serovarTyphimurium and *Yersinia enterocolitica* in mice. *J Bacteriol.* 192 (1):21-22.
56. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB (2003) Bacteria – host communication: the language of hormones. *Proc Nat Acad Sci.* 100 (15): 8951-8956.
57. Stanley NR, Lazazzera BA (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.* 52: 917-924.
58. Steenackers H, Hermans K, Vanderlyden J, keersmaeckers SCJD (2012) *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int.* 45: 502–531.
59. Surette MG, Bassler BL (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc Nat Acad Sci USA.* 95: 7046–7050.
60. Surette MG, Miller MB, Bassler BL (1999).Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Nat Acad Sci USA.* 96: 1634-1644.
61. Taga ME, Miller ST, Bassler BL (2003) Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol.* 50 (4): 1411-1427.
62. Taga, ME, Semmelhack JL, Bassler BL (2001) The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella*Typhimurium. *Mol Microbiol.* 42 (3): 777-793.
63. Viana EDS, Campos MEM, Ponce AR, Mantovani HC, Vanetti MCD (2009) Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. *Biol Res.* 42: 427-436.
64. Walters M, Sperandio V (2006) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol.* 296: 125-131.
65. Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, Simpsons NJL, Salmond GPC (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 25: 365-404.
66. Widmer KW, Jesudhasan P, Pillai SD (2012) Fatty acid modulation of autoinducer (AI-2) influenced growth and macrophage invasion by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis* 9(3): 211-217.

67. Widmer KW, Jesudhasan PR, Dowd SE, Pillai SD (2007) Differential expression of virulence-related genes in a *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *luxS* mutant in response to autoinducer AI-2 and poultry meat-derived AI-2 inhibitor. *Foodborne Pathog Dis.* 4 (1): 5-15.
68. Xavier KB, Bassler BL (2005) Regulation of uptake and processing of the quorum sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187 (1): 238-258.
69. Xavier KB, Bassler BL (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin.* 6: 191-197.

CAPITULO 02

Avaliação dos genes envolvidos no sistema *quorum sensing* de *Salmonella enterica* Enteritidis PT4

Capítulo formatado segundo normas da revista
Archives of Microbiology

Resumo

Salmonella sp. está entre os principais agentes causadores de doenças de origem alimentar e, dentre os sorovares mais frequentemente envolvidos em surtos, destacam-se *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. Alguns fenótipos relacionados ao aumento de resistência a drogas e ao aumento da virulência foram reconhecidos como regulados pelo mecanismo de *quorum sensing* (QS) em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Neste estudo, foi caracterizado o mecanismo de QS mediado pelos autoindutores (AIs) 1 e 2 no patógeno humano *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4. A análise da sequência de nucleotídeos da proteína reguladora de resposta do QS mediado pelo AI-1 (SdiA) demonstra a conservação do gene *sdiA* neste sorovar. O modelo da regulação do QS mediado pelo AI-2 foi identificado em *Salmonella* Enteritidis, após a identificação e posicionamento dos genes no genoma. A elucidação dos mecanismos de QS mediados por AI-1 e AI-2 em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis possibilitará o desenvolvimento de novas estratégias de controle deste patógeno, ao caracterizar novos alvos para drogas antimicrobianas.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, *quorum sensing*, AI-1 e AI-2.

1. Introdução

Salmonella spp. fazem parte da família Enterobacteriaceae e são agentes causais de uma ampla variedade de doenças em seres humanos e animais, incluindo febre entérica e gastroenterite (Gunn 2011). As infecções mais frequentes causadas pela ingestão de alimentos contaminados por *Salmonella* resultam em gastroenterite e são causadas por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e, ou sorovar Enteritidis (Ahmer e Gunn 2011; Gunn 2011; Hilbert et al. 2012).

Os prejuízos econômicos associados às infecções por *Salmonella* têm atraído cada vez mais atenção dos países desenvolvidos, em particular nos Estados Unidos, Canadá e países da Europa, embora o impacto possa ser bem maior nos países em desenvolvimento, para os quais existem poucos dados disponíveis. Os custos financeiros não são apenas associados à investigação, prevenção e tratamento de doenças humanas, mas também à manutenção de condições sanitárias adequadas em toda a cadeia de produção de alimentos e afetam, tanto os setores público quanto o privado (Sockett 1991).

O sistema de sinalização dependente da densidade celular, *quorum sensing* (QS), foi descrito por Nealson e Hastings (1979) ao relatarem o fenótipo de bioluminescência produzida por *Vibrio fischeri*. Mais tarde, este mecanismo de comunicação celular dependente de quorum foi caracterizado em muitas outras espécies de bactérias. Neste sistema, as células são capazes de monitorar a presença de outras bactérias ao seu redor pela produção e resposta a moléculas sinalizadoras de baixa massa molecular denominadas autoindutores (AIs) (Fuqua et al. 1994; Taga e Bassler 2003).

A comunicação intracelular mediada pelo QS é usada para regular uma ampla variedade de processos na comunidade bacteriana (Miller e Bassler 2001, Ng e Bassler 2009), incluindo formação de biofilme (Inhulsen et al. 2012), resistência a antibióticos (Dieppois et al. 2012), indução de fatores de virulência (O'Grady, Viteri e Sokol 2012), diferenciação celular e fluxo de nutrientes, defesa coletiva contra outros micro-organismos competidores ou contra mecanismos de defesa do hospedeiro eucarioto (March e Bentley 2004), além de otimizar a sobrevivência da população por meio da diferenciação em formas morfológicas melhor adaptadas às adversidades ambientais, dentre outros eventos fisiológicos da bactéria (Swift et al. 2001; Williams, 2007).

O sistema QS tem sido estudado extensivamente em bactérias patogênicas e deterioradoras, objetivando-se elucidar quais os mecanismos envolvidos na regulação de processos infecciosos e aqueles envolvidos na deterioração dos alimentos (Bai e Rai 2011). No gênero *Salmonella*, o sistema de QS é mais estudado em *Salmonella* Typhimurium, porém acredita-se que os diferentes sorovares de *Salmonella* spp. também possuam os mesmos sistemas de QS identificados neste sorovar (Halatsi et al. 2006).

O primeiro sistema de QS em *Salmonella* spp. é incompleto por não codificar o homólogo da sintase de AI-1, denominado LuxI e apresentar apenas a proteína reguladora de resposta (SdiA), homóloga a LuxR (Ahmer et al. 1998). A atividade de SdiA em *Salmonella* Typhimurium foi detectada no intestino de tartaruga colonizada

por *Aeromonas hydrophila* (Smith et al. 2008) e em camundongos colonizados por *Yersinia enterocolitica* (Dzsel et al. 2010). Ambas bactérias são patogênicas e produtoras de AIs. Nestas situações de competição, *Salmonella* Typhimurium presente no intestino destes animais e contendo a proteína reguladora de resposta do QS, intercepta e decodifica a mensagem de competidores mediada por AIs para desenvolver estratégias para sobrevivência e para vencer a competição (Sperandio 2010; Ahmer e Gunn 2011).

O segundo sistema de QS conhecido em *Salmonella* é mediado pelo AI-2, cuja internalização é dependente de um transportador ABC (*ATP binding cassette*) nomeado de transportador Lsr. O operon *lsr* contém sete genes, *lsrACDBFGE*, sendo sua transcrição induzida por AI-2 (Taga et al. 2001; 2003; Byrd e Bentley 2009).

O terceiro sistema QS presente em *Salmonella* spp. é mediado pelo AI-3, mas é pouco conhecido. Este mecanismo de comunicação apresenta características em comum ao que utiliza o AI-2, porém ao contrário do AI-2, o sistema QS é mediado por AI-3 também utiliza hormônios humanos, adrenalina e noradrenalina, como sinalizadores (Walter e Sperandio 2006).

Devido ao impacto do QS na patogenicidade microbiana existe um grande interesse em desenvolver sistemas para interromper ou manipular o processo de sinalização célula-célula a fim de alterar comportamentos regulados por QS. Há uma demanda crescente por estudos a fim de melhor compreender processos e funções mediados pelas moléculas autoindutoras do QS (Schertzer, Boutlete e Whiteley 2009).

A caracterização do QS tem revelado diferentes níveis evolutivos de conservação para três sistemas de comunicação entre as bactérias. Genes codificadores dos sistemas QS mediados pelos AI-1, AI-2 e AI-3 não são totalmente conservados e apresentam variação dentro da mesma espécie. Este fato sugere perdas ou ganhos de genes supostamente por meio do mecanismo de transferência horizontal de genes (Lerat e Moran 2004). No entanto, a conservação de sequências de genes envolvidos no QS pode ocorrer dentro do mesmo gênero de bactérias e, até mesmo, entre bactérias pertencentes a uma mesma família (Gray e Garey 2011).

O conhecimento das relações em nível molecular, entre as espécies é essencial para muitas inferências em biologia e tem-se despendido um esforço proporcionalmente grande em reconstruir esta relação dentre os organismos de estudo (Mcquiston et al. 2008). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o sistema QS de *Salmonella* Enteritidis PT4 mediados pelos AIs 1 e 2 e realizar a análise comparativa de sequências de nucleotídeos codificadores da proteína reguladora de resposta do

mecanismo QS mediado por AI-1 (proteína SdiA), visando encontrar relações interespecies, gêneros e, ou entre diferentes sorovares.

2. Materiais e Métodos

Bactérias e condições de cultivo

A estirpe bacteriana de estudo, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis fagotipo PT4 578, foi isolada de peito de frango e cedida pela FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil). As outras estirpes utilizadas foram *A. hydrophila* 069 (controle positivo para produção de AHL) e a bactéria monitora de QS mediado pelo AI-1(AHL), *Chromobacterium violaceum* CV026. Os estoques das culturas de bactérias foram feitos em caldo Luria Bertani (LB) (triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 % e NaCl 0,4 %), pH 7,4, contendo 33 % de solução de glicerol 50 em água esterilizada e congelado a -80°C . Antes de cada experimento, as células foram reativadas em caldo LB ou caldo LB acrescido do antibiótico específico, quando necessário, com incubação a 37°C para *Salmonella* e 30°C para *A. hydrophila* e *C. violaceum*, por 18 h.

Caracterização da produção de AHL

A estirpe de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi incubada em 200 ml de caldo LB a 37°C , por 24 h. Em seguida, foi centrifugada a $10\ 000\ g$ por 10 min em micro centrífuga Sorvall (modelo MC12V, Dupont, EUA). A extração de AHL do sobrenadante foi feita segundo Ravn e colaboradores (2001), com modificações. O sobrenadante foi vertido em funil de separação, acrescido de 200 ml de acetato de etila acidificado com ácido fórmico 0,5 % e, posteriormente, homogeneizado, seguido de tempo de repouso para separar as fases. Estes dois últimos procedimentos foram repetidos três vezes. A fase orgânica foi retirada e adicionada novamente em funil de separação, acrescido de mais 200 ml de acetato de etila e procedeu-se à repetição dos procedimentos de agitação e repouso. A fase contendo acetato de etila foi retirada e transferida para um Erlenmeyer esterilizado para ser concentrada em evaporador rotativo (modelo Q344B, Quimis, Brasil) a 42°C para posterior ressuspensão em $600\ \mu\text{l}$ de acetato de etila e congelamento a -20°C . A estirpe *A. hydrophila* 069 foi utilizada como controle positivo para produção de AHL e o procedimento de extração de AHL do sobrenadante da cultura foi feito como descrito acima. Após obtenção das moléculas

sinalizadoras, as mesmas foram identificadas por meio de cromatografia em camada fina (TLC).

Na análise por TLC foram utilizados como padrões, as seguintes AHLs: *N*-hexanoil homoserina lactona e *N*-butanoil-DL-homoserina lactona (Fluka, Suíça). Os padrões e as amostras foram aplicados em placas de cromatografia em camada fina de fase reversa (C₁₈, RP 254s, Merck, Alemanha), medindo 20 x 20 cm, em volumes de 10 a 20 µl. Os cromatogramas foram desenvolvidos no sistema de solvente metanol/água (60:40, v/v). Depois do tempo de corrida, o solvente foi evaporado e as placas secas foram recobertas com a cultura da bactéria preparada como se segue: vinte ml da cultura de *C. violaceum* 026 ativada por 24 h foram usados para inocular 200 ml de ágar LB 0,65 %. Após homogeneização, a cultura foi espalhada uniformemente sobre a superfície da placa emoldurada com uma proteção para impedir o derramamento do ágar. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C por 16 a 24 h, em um recipiente plástico umidificado, devidamente fechado (Ravn et al. 2001; Christensen et al. 2003). Neste ensaio, a produção de violaceína por *C.violaceum* resultou em manchas de coloração violeta nas placas e foi considerada como resultado positivo para a presença de AHLs (Shaw et al. 1997).

Efeito da adição de AHL sobre o crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4

O efeito de AHLs sintéticas no crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi avaliado pelo ensaio em microplacas, utilizando-se o caldo LB. A estirpe *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi cultivada por, aproximadamente, 18 h a 37 °C, sob agitação. Em 10 ml de caldo LB, em seguida, as células foram coletadas por centrifugação em micro centrífuga Sorvall (modelo MC12V, Dupont, EUA), a 4.300 g, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado ressuspendido em 1,5 ml de solução salina 0,85 % e, novamente centrifugado na mesma velocidade e tempo. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e a densidade óptica das células foi padronizada de forma a se obter uma população equivalente a 10⁷ UFC ml⁻¹. Um volume de 20 µl dessa suspensão foi adicionado a 180 µl de caldo LB distribuído em microplacas de poliestireno de 96 poços e acrescido de concentrações de 100 nM das diferentes AHLs: *N*-hexanoilhomoserina lactona (Fluka), *N*-octanoil homoserina lactona (Fluka), *N*-decanoil homoserina lactona (Sigma) e *N*-dodecanoil homoserina lactona (Fluka). A microplaca foi incubada a 37 °C, sem agitação. A densidade óptica foi determinada a 630 nm Leitor de Elisa VERSA MAX (Molecular Devices, Califórnia, EUA) de 30 em

30 min até atingir a fase estacionária. Esse experimento foi realizado em oito réplicas e três repetições.

***Touchdown* PCR para amplificação dos genes de QS mediado pelos AIs 1 e 2**

A caracterização do sistema QS em *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi feita baseada na extrapolação das informações elucidadas de *Salmonella* Typhimurium. A extração do DNA genômico de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi realizada por meio do kit *Wizard*[®] *Genomic DNA Purification* (Promega). Quatro programas de *Touchdown* PCR segundo Korbie e Mattick (2008) foram criados para amplificação dos 11 genes pertencentes ao mecanismo de QS mediados pelo AI-1 e AI-2 de *Salmonella* Enteritidis PT4 578, identificados inicialmente em *Salmonella* Typhimurium (Taga et al 2003), operon *lsr* (10 genes) e *sdiA*. Os pares de oligonucleotídeos (Tabela suplementar 1) foram construídos com base no genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4 P125109 depositado no GenBank (Acesso NC_011294.1) por Thomsom e colaboradores (2008) e *Salmonella* Typhimurium LT2 (Acesso AE_006468). O programa de *Touchdown* PCR se baseia em três fases, a primeira fase constituída de uma etapa de desnaturação a 95 °C (3 min), seguida por outra etapa de desnaturação a 95 °C (30 s), etapa de anelamento com um acréscimo de 10 °C da temperatura de anelamento (T_m) desejada, finalizando com uma etapa de extensão a 72 °C (70 s), repetindo os passos por 10 vezes. A segunda fase é caracterizada de uma etapa de desnaturação a 95 °C (30 s), seguida por uma sequência de ciclos de anelamento da T_m desejada acrescida de 5 °C até T_m desejada por 40 s, diminuindo 1 °C a cada ciclo por 6 ciclos consecutivos e um ciclo de extensão de 72 °C (70 s). Quando a T_m desejada é atingida, o ciclo é repetido 19 vezes. A terceira fase corresponde ao um ciclo a 72 °C (5 min). Os programas foram diferenciados pelas T_m desejadas, 48 °C, 50 °C, 56 °C e 59 °C. As reações de PCR foram executadas com um volume de 25 µl contendo 100 ng de DNA, 1 µl de cada oligonucleotídeo, direto e reverso na concentração de 10 pmol, 12,5 µl de *GoTaq*[®] *Colorless Master Mix* (Promega, USA) e 9,5 µl de H₂O. Os produtos obtidos por PCR foram purificados com kit *Wizard*[®] *SV gel and PCR Clean-up system* (Promega) e enviados para sequenciamento na Macrogen In, na Coréia do Sul.

Análises *in silico*

Modelo de QS mediado pelo AI-2

A fim de determinar se a organização dos genes pertencentes ao sistema QS mediado pelo AI-2 de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 é a mesma de *Salmonella* Typhimurium apresentada por Taga e colaboradores (2001), os genes foram amplificados por meio da técnica *Touchdown* PCR (descrita acima) e sequenciados. As respectivas sequências foram identificadas no genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4 P125109 (NC_011294) depositada por Thomsom e colaboradores (2008) com o auxílio da ferramenta *BlastN*. As posições e direcionamentos dos genes foram identificados com auxílio da ferramenta *Graphics* disponível no NCBI (National Center for Biotechnology Information) para genomas sequenciados.

Análise filogenética do gene *sdiA* (QS mediado por AI-1)

Uma análise filogenética foi realizada com o objetivo de comparar sequências nucleotídicas codificadoras da proteína reguladora de resposta de QS, SdiA, de sistemas QS. As sequências foram obtidas no banco de dados GenBank na página do NCBI. As espécies de bactérias seguidas de seus respectivos números de acesso são: *Citrobacter freundii* 4747CFAA (ZP_09336017.1); *Citrobacter koseri* ATCC BAA895 (YP_001452611.1); *Citrobacter rodentium* ICC168 (YP_003365526.1); *Citrobacter youngae* ATCC 29220 (ZP_06352425.1); *Cronobacter turicensis* Z3032 (YP_003210982.1), *E. coli* BW2952 (YP_002926921.1); *E. coli* DH1 (YP_006129257.1); *E. coli* E101 (EH_O00167.1); *E. coli* O103 H2 (YP_003222098.1); *E. coli* O55H7 CB9615 (YP_003499911.1); *E. coli* TW14359 (YP_003078403.1); *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (YP_003611882.1); *Enterobacter hormaechei* ATCC 49162 (ZP_08498664.1); *Erwinia billingiae* Eb661 (YP_003740953.1); *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 (YP_001336067.1); *Pantoea ananatis* LMG 20103 (YP_003519711.1); *Salmonella bongori* NCTC 12419 (YP_004730634.1); *Salmonella* Choleraesuis SCSA50 (ZP_09760024); *Salmonella* Dublin SD3246 (ZP_09763785.1); *Salmonella* Dublin CT02021853 (YP_002215136); *Salmonella* Agona (YP_002146073); *Salmonella* Enteritidis P125109 (YP_002243187); *Salmonella* Gallinarum (YP_002226156); *Salmonella* Heidelberg B182 (AF_H45905.1); *Salmonella* Heidelberg SL476 (YP_002046001); *Salmonella* Newport SL254 (AC_F63987.1); *Salmonella* Paratyphi A (YP_150210); *Salmonella* Paratyphi C (YP_002637347); *Salmonella* Schwarzengrund (ZP_02664244); *Salmonella*

Schwarzengrundstr CVM19633 (YP_002114983); *Salmonella* Typhi (CA_D05699); *Salmonella* Typhi Ty2 (NP_804754); *Salmonella* Typhimurium LT2 (NP_460903); *Salmonella* Typhimurium SL1344 (YP_005181773); *Shigella boydii* (YP_001879705); *Shigella sonnei* (YP_310157); *Yokenella regensburgei* ATCC 43003 (ZP_09390474). Além das sequências de nucleotídeos de espécies retiradas do GenBank, também foi utilizada a sequência de nucleotídeos que codifica a proteína SdiA a partir do DNA total extraído do isolado de estudo, *Salmonella* Enteritidis PT4 578.

O alinhamento manual destas sequências de nucleotídeos foi realizado no programa Mega 5.0 (Kumar et al. 2008; Tamura et al. 2011) de acordo com a sequência de aminoácidos traduzida que corresponde a proteína SdiA.

A análise filogenética foi realizada por meio do método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou e Nei 1987) utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros (seed=64238). O teste não-paramétrico ou *bootstrap* (Felsenstein 1985) com 100.000 réplicas foi utilizado para estimar a robustez de cada ramo interno da árvore, uma vez que oferece suporte estatístico, indicando a confiabilidade dos dados da análise.

3. Resultados e Discussão

Quorum sensing em Salmonella Enteritidis PT4 578

Por meio da ferramenta *BlastN* não foi encontrado gene homólogo a *luxI* no genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Foi feita uma PCR com pares de oligonucleotídeos para homólogos de *luxI* das enterobactérias *H. alvei*, *A. hydrophila* e *E. cloacae* e nenhum fragmento de DNA foi observado em gel de agarose 1,5 % (dados não mostrados). Estes resultados indicam que *Salmonella* Enteritidis PT4 578 não apresenta sintase de AI-1. A confirmação da ausência de produção da molécula sinal (AI-1) no isolado em estudo foi realizada por meio de TLC (Fig. 1). Observou-se que *Salmonella* Enteritidis PT4 578 não produziu AI-1 detectado pela bactéria monitora *C. violaceum* (Fig.1).

O sistema incompleto de QS mediado pelo AI-1 foi inicialmente descrito em *E. coli*, que não possui a sintase do AI-1 e a LuxI, que é a proteína homóloga a LuxR, foi denominada de SdiA (Sitnikov et al. 1996). A presença de *sdiA* no genoma de *Salmonella* Typhimurium foi identificada por meio de análises de alinhamento por Ahmer e colaboradores (1998). Não foi encontrado o gene homólogo a *luxI* no

genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e a confirmação de que este sorovar não produz AHL não impede que o mesmo responda às AHLs produzidas por outros microorganismos.

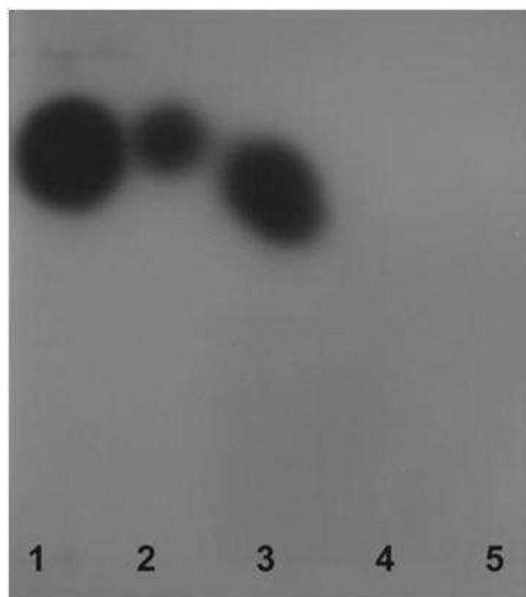


Fig. 1. Cromatografia em Camada Fina (TLC) do extrato de AHLs obtido de *Salmonella* Enteritidis PT4 e *A. hydrophila* cultivadas em caldo LB por 18 h revelada com a estirpe monitora *C. violaceum* CV026. 1) Padrão *N*-butanoil homoserina lactona 1 mg ml^{-1} ($6\ \mu\text{l}$). 2) Padrão *N*-hexanoil homoserina lactona $0,1\ \text{mg ml}^{-1}$ ($6\ \mu\text{l}$). 3) Extrato do sobrenadante livre de células de *A. hydrophila* 069 ($60\ \mu\text{l}$). 4) Extrato do meio de cultura ($60\ \mu\text{l}$). 5) Extrato do sobrenadante livre de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 ($60\ \mu\text{l}$).

Para avaliar se a presença de AHL interfere no crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foram feitas curvas de crescimento deste patógeno na presença de diferentes AHLs. Observou-se que a concentração de $100\ \text{nM}$ desta molécula sinalizadora não afetou o crescimento bacteriano (Fig. 2).

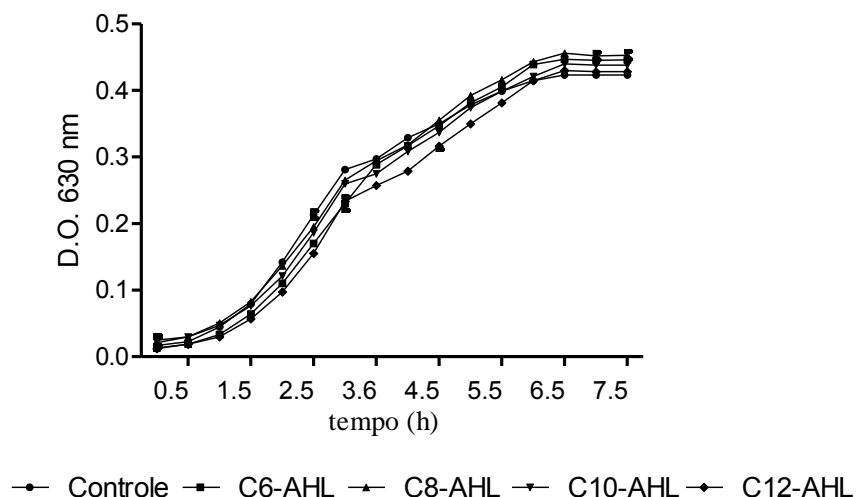


Fig. 2. Crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 por 7.5 h em caldo LB na presença das AHLs: *N*-hexanoil homoserina lactona, *N*-octanoil homoserina lactona, *N*-decanoil homoserina lactona e *N*-dodecanoil homoserina lactona 100 nM.

Michael e colaboradores (2001) demonstraram que, dependendo da AHL avaliada, concentração de 1 nM é suficiente para induzir a expressão do gene *sdiA* em *Salmonella* Typhimurium. A determinação de concentrações de AHL que não interferem negativamente no crescimento do micro-organismo é importante para o estudo de fenótipos regulados por este autoindutor, pois pode-se buscar fenótipos estimulados por este sinal.

Os genes codificadores de produtos pertencentes aos sistemas QS mediados pelos AI-1 e AI-2 foram identificados no genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2 (AE_006468) e, por meio da ferramenta *BlastN*, os genes correspondentes em *Salmonella* Enteritidis PT4 P125109 (NC_01294) foram identificados. Por fim, os mesmos genes foram identificados no isolado em estudo, *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (Fig.3, Tabela 1). Os genes foram sequenciados e apresentaram identidade superior a 99 % quando comparado às sequências dos genes de *Salmonella* Enteritidis PT4 P125109 (NC_01294).

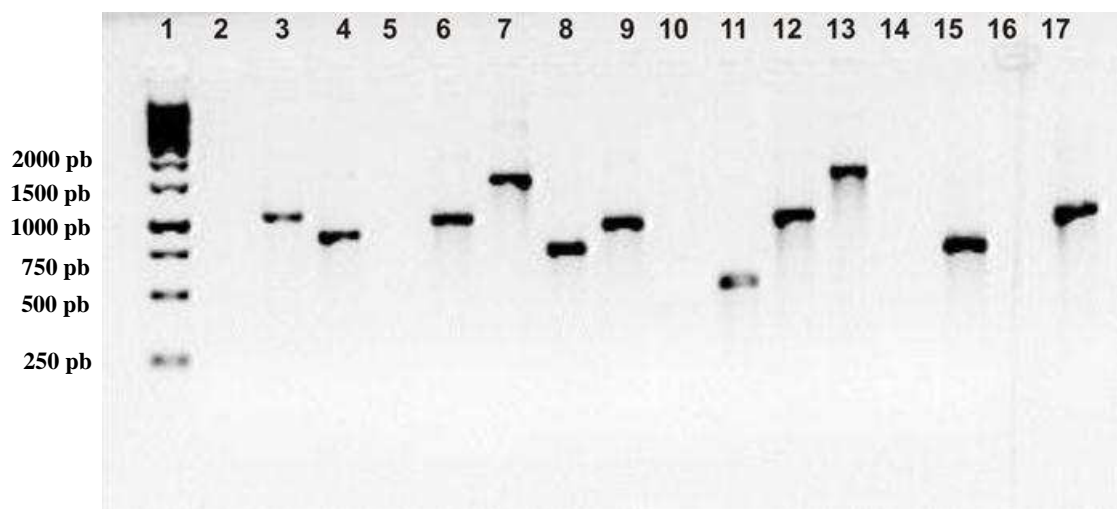


Fig. 3. Detecção dos genes pertencentes do sistema QS mediado por AI-1 e AI-2 em *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Gel de agarose 1,5 % contendo fragmentos de DNA gerados pela técnica de *Touchdown* PCR ao amplificamos 11 genes pertencentes ao mecanismo de QS mediado pelo AI-1 e AI-2 em *Salmonella* Enteritidis PT4 578. 1) Marcador DNA ladder 1 Kb Gene Ruler™ (Fermentas); 2) Branco; 3) *ydeY*; 4) *yneB*; 5) Branco; 6) *yneA*; 7) *ego*; 8) *sen3870*; 9) *ydeW*; 10) Branco; 11) *luxS*; 12) *ydeZ*; 13) *ydeV*; 14) Branco; 15) *sdiA*; 16) Branco e 17) *yneC*.

Na literatura há numerosas informações a respeito do sistema QS em *Salmonella* Typhimurium. Muitas descobertas foram feitas e permanece a busca por maiores esclarecimentos do mecanismo de QS nesse patógeno alimentar (Soares e Ahmer 2011). Ao analisar o genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4 P125109 (NC_01294) sequenciado em 2008 por Thomsom e colaboradores, foi observada a presença do gene *sdiA*, codificador da proteína reguladora de resposta, SdiA. A identificação do mesmo gene foi feita em *Salmonella* Enteritidis PT4 578 e sua sequência apresenta 723 pb (Fig. 3-canaleta?15). Acredita-se que SdiA é um sensor de AHLs produzidas por outras espécies bacterianas, possivelmente no trato gastrointestinal de mamíferos como descrito por Sperandio (2010) e por Ahmer e Gunn (2011).

SdiA regula positivamente dois *loci* em *Salmonella* Typhimurium, o operon *reck* e o operon *srgABC*, presentes no plasmídeo de virulência, o primeiro é responsável por aumentar a resistência à respostas de defesa do hospedeiro enquanto a verdadeira função do segundo operon não foi esclarecida (Ahmer et al. 1998, Michael et al. 2001). Outro possível gene regulado por SdiA é o *srgE*, gene adquirido por transferência horizontal com função desconhecida (Sabag-Daigle et al. 2012).

Tab 1. Pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificação de genes dos sistema QS de *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 578 (NC_01294), baseados nas sequências dos genes do genoma de *Salmonella enterica* Typhimurium e respectivas funções (Thomson et al. 2008).

<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Pares de oligonucleotídeos	Função dos genes	Identidade (nt)
<i>sdiA</i>	<i>sdiA</i>	D:ATTGTCGACAAATGATTTCTTCACCTGGCGACGC R: ATTTCTAGATCATATCAGACCTGTCGCCGCA	Proteína reguladora de divisão celular e proteína reguladora de resposta do sistema QS mediado por AI-1.	99 %
<i>luxS</i>	<i>luxS</i>	D: ATTGTCGACAAATATGCAATTCCTGCAGTTT R: ATTTCTAGAGCCATTATTAGATAGCTTCGCAGT	Sintase do AI-2.	100%
<i>lsrA</i>	ego	D: TGCAAATCAGTCACAATACTGC R: CTCCGACGCACCATGTTC	Proteína putativa, sistema de transporte Abc, de ligação ao ATP.	99%
<i>lsrB</i>	yneA	D: TGGCAAGACACAGCATTAAAA R: TCATATTTGTCGATATTGTCTTTGTTG	Proteína putativa, sistema de transporte ABC.	99%
<i>lsrC</i>	ydeY	D: TGTTGAAATTCATCCAAAATAACC R: TCATGCCACCTCTTTGTTTTT	Proteína putativa permeasse, sistema de transporte ABC.	99%
<i>lsrD</i>	ydeZ	D: GATGAATCCATGGCGACGCTATAGC R: TCATGCCTGATGCGCATTGCGA	Proteína putativa de membrana, sistema de transporte ABC.	99%
<i>lsrE</i>	Sen3870	D: ACAGCCAGTTTGCCGGATTA R: TTATGCTGTGGAGGGTAAGAAA	Ribulose fosfato-3-epimerase putativa.	99%
<i>lsrF</i>	yneB	D: TGGCTGATTTAGATGATATTAAGATG R: CTTTCTCACTCAAAAACAGCTCAT	Aldolase putativa.	99%
<i>lsrG</i>	yneC	D: TCCATGGCGACGCTATAGCTGG R: GCCTGATGCGCATTGCGACG	Proteína modificadora do AI-2.	99%
<i>lsrK</i>	ydeV	D: TTACAGGCCTGGCGCTTTCCA R: TGGCTCGACTCTGTACCCATACTG	Açucar quinase putativa.	99%
<i>lsrR</i>	ydeW	D: TTGAATTATTTCCCTGCGGTTT R: ATGAGCGATAATACGTTGGTATCTG	Proteína reguladora putativa.	99%

Contudo, segundo análises *in silico* da sequência de nucleotídeo, realizadas por esses mesmos autores, sugerem que a proteína SrgE pode estar envolvida em sistemas de secreção tipo III (Sabag-Daigle et al. 2012).

Os outros genes identificados no genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (Fig. 3) pertencem ao sistema mediado pelo AI-2, onde *luxS* codifica sintase do AI-2 e os outros genes fazem parte de um operon responsável por transportar o AI-2. A partir da identificação dos genes do sistema Qs mediado pelo AI-2 foi feito um estudo *in silico* de posicionamento desses genes para prever o modelo de organização a partir do genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4 (NC_01294) do GenBank.

Os genes pertencentes ao operon responsável pelo transporte e modulação do AI-2 foram identificados no genoma sequenciado de *Salmonella* Enteritidis PT4 P125109 (NC_011294), na região entre 4,1485 Mpb e 4,1585 Mpb. Essas informações foram usadas para comparar com o modelo de sistema QS mediado pelo AI-2 em *Salmonella* Typhimurium proposto por Taga e colaboradores (2001). Concluiu-se que a organização deste sistema QS mediado pelo AI-2 é igual nos dois sorovares (Fig. 4). O modelo proposto para *Salmonella* Enteritidis PT4 578 também foi igual ao modelo proposto para a organização do operon *lsr* em *E. coli* (Taga et al. 2001) e, estes resultados mostram que o mecanismo mediado pelo AI-2 é conservado entre essas espécies. A partir do modelo proposto será possível investigar se fenótipos regulados por AI-2 em *Salmonella* Typhimurium também tem a mesma regulação em *Salmonella* Enteritidis PT4 578.

O alinhamento dos genes de *Salmonella* Enteritidis PT4 feito com o genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4 P125109 permitiu identificar genes de QS mediado pelo AI-2 e confirmar a presença de apenas uma cópia, por meio da ferramenta *BlastN*, no genoma de *Salmonella* Enteritidis PT4. Neste sorovar, o operon *lsr* está representado pelos genes *ydeV*, *ydeW*, *ego*, *ydeY*, *ydeZ*, *yneA*, *yneB*, *yneC* e *sen3870* (Fig. 4), genes importantes por codificarem proteínas responsáveis pelo transporte e modulação do AI-2. Nesse sistema mediado pelo AI-2 também está presente o gene *luxS*, situado em outra porção do genoma e codifica sintase do AI-2.

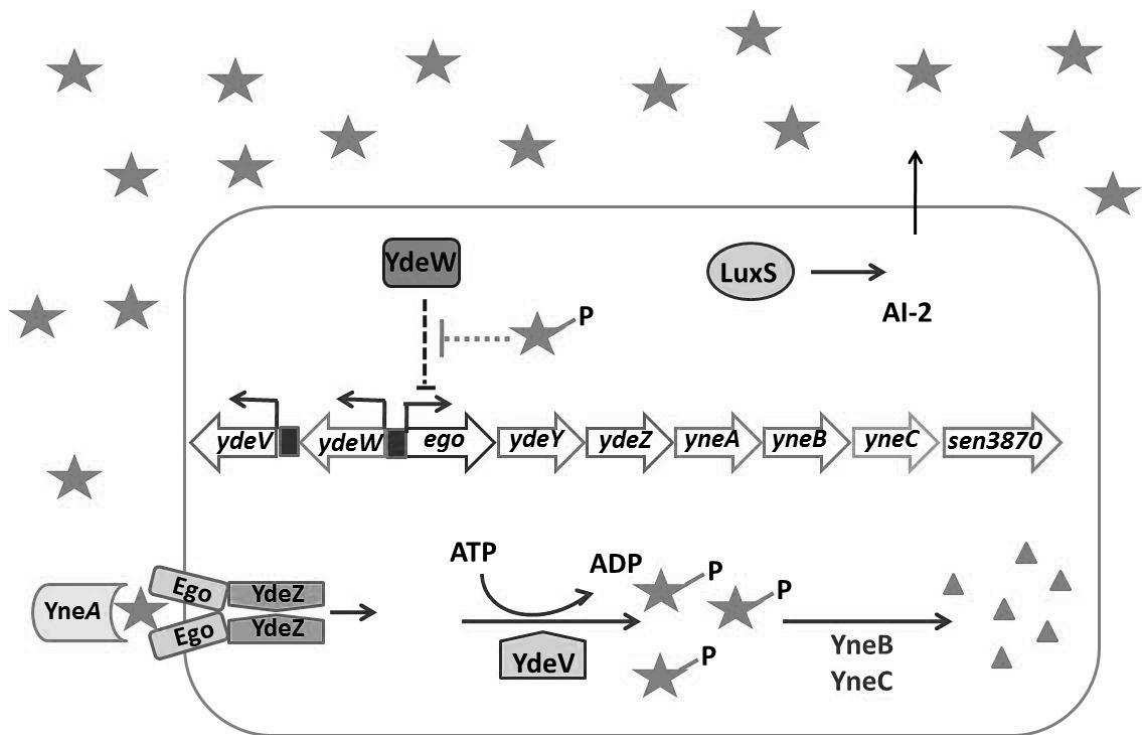


Fig. 4. Modelo proposto para a possível regulação do sistema QS mediado pelo AI-2, em *Salmonella* Enteritidis PT4 578. O AI-2 (estrela) é sintetizado por LuxS e acumulado no meio extracelular. A expressão basal do sistema de transporte ABC (YneA, Ego e YdeZ) codificado pelo operon presente neste esquema permite que alguns AI-2 entrem no citoplasma, onde é fosforilado por YdeV. O AI-2 fosforilado induz a transcrição do operon por meio da inativação de YdeW. Altas concentrações de AI-2 fosforilado é processado por YneB e YneC.

No sistema QS mediado pelo AI-2, esta molécula sinal é sintetizada por LuxS e liberada no meio extracelular. Altas concentrações desta molécula no meio externo e expressão basal dos codificadores do sistema de transporte ABC permitem a entrada do AI-2 para o citoplasma. O sistema de transporte é formado por YneA, equivalente a proteína LsrB, Ego equivalente a LsrA e YdeZ equivalente a lsrD, do operon *lsr* de *Salmonella* Typhimurium. A proteína YdeV que corresponde a proteína LsrK de *Salmonella* Typhimurium é responsável por fosforilar o AI-2 e, desta forma, essa molécula pode agir como regulador transcricional, induzindo a transcrição deste operon por inativar YdeW, correspondente ao LsrR. A concentração do AI-2 é diminuída na presença de YneB e YneC, equivalentes às proteínas LsrF e LsrG, por mecanismos não elucidados. Nenhum produto dos outros genes pertencentes desse operon não foi relacionado diretamente ao sistema mediado pelo AI-2 e as suas possíveis funções estão evidenciadas na Tabela 1.

No modelo proposto para *Salmonella* Typhimurium, a regulação de AI-2 é dada pelo operon *lsrACDBFGE* (Taga et al. 2001). Os quatro primeiros genes *lsrACDB* codificam os componentes de importação do AI-2. A função dos outros três genes *lsrFGE* é desconhecida, entretanto análises das sequências nucleotídicas sugerem que *lsrF* codifica uma aldolase (Taga et al. 2003) O gene *lsrE* é homólogo a *rpe* que codifica ribulose fosfato isomerase (Taga et al. 2003). O gene *lsrG* codifica uma proteína conservada de função não conhecida (Taga et al. 2003). O gene *lsrR*, localizado *upstream* a *lsrA* codifica um repressor transcricional e é transcrito divergentemente do operon *lsr*. LsrR reprime a transcrição do operon *lsr* na ausência do AI-2 e a presença do mesmo resulta em desrepressão (Taga et al. 2001; Taga et al. 2003; Byrd e Bentley 2009).

Análise filogenética do gene *sdiA* (QS mediado por AI-1)

O relacionamento filogenético da sequência de nucleotídeos da proteína SdiA é representado na árvore consenso gerada pela análise de NJ (Fig. 5). Os valores ao lado de cada nó ancestral, posicionados da esquerda para a direita, correspondem ao valor de *bootstrap*. Os ramos das árvores cujos valores de *bootstrap* estavam abaixo de 80 % foram omitidos. O motivo para tal é que valores abaixo de 80 % indicam uma baixa confiabilidade dos dados com pouco suporte estatístico (Harada et al. 1995).

Estudo filogenético realizado por Case, Labbate e Kjelleberg (2008) mostrou que, de todos os genomas bacterianos depositados no banco de dados até 2008, 45 bactérias apresentavam homólogo a LuxR, porém não apresentavam a sintase de AHL correspondente.

A fim de encontrar regiões conservadas em sequências nucleotídicas do gene codificador da proteína reguladora de resposta (homóloga a LuxR) e prever relações interespecies, gêneros e, ou em sorovares com a árvore obtida, optou-se por analisar um grupo menor de bactérias e selecionou-se aquelas que apresentam *sdiA*. Assim, foram analisadas sequências nucleotídicas do gene codificador da proteína SdiA de diferentes espécies, gêneros e sorovares de bactérias disponíveis no banco de dados.

A árvore obtida (Fig. 5) demonstra que as sequências nucleotídicas dos genes que codificam a proteína reguladora de resposta, SdiA, apresentam-se conservadas dentre os organismos do mesmo gênero (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*) baseado no suporte estatístico conferido pelos valores de *bootstrap* acima de 80 % que precede a cada ramo.

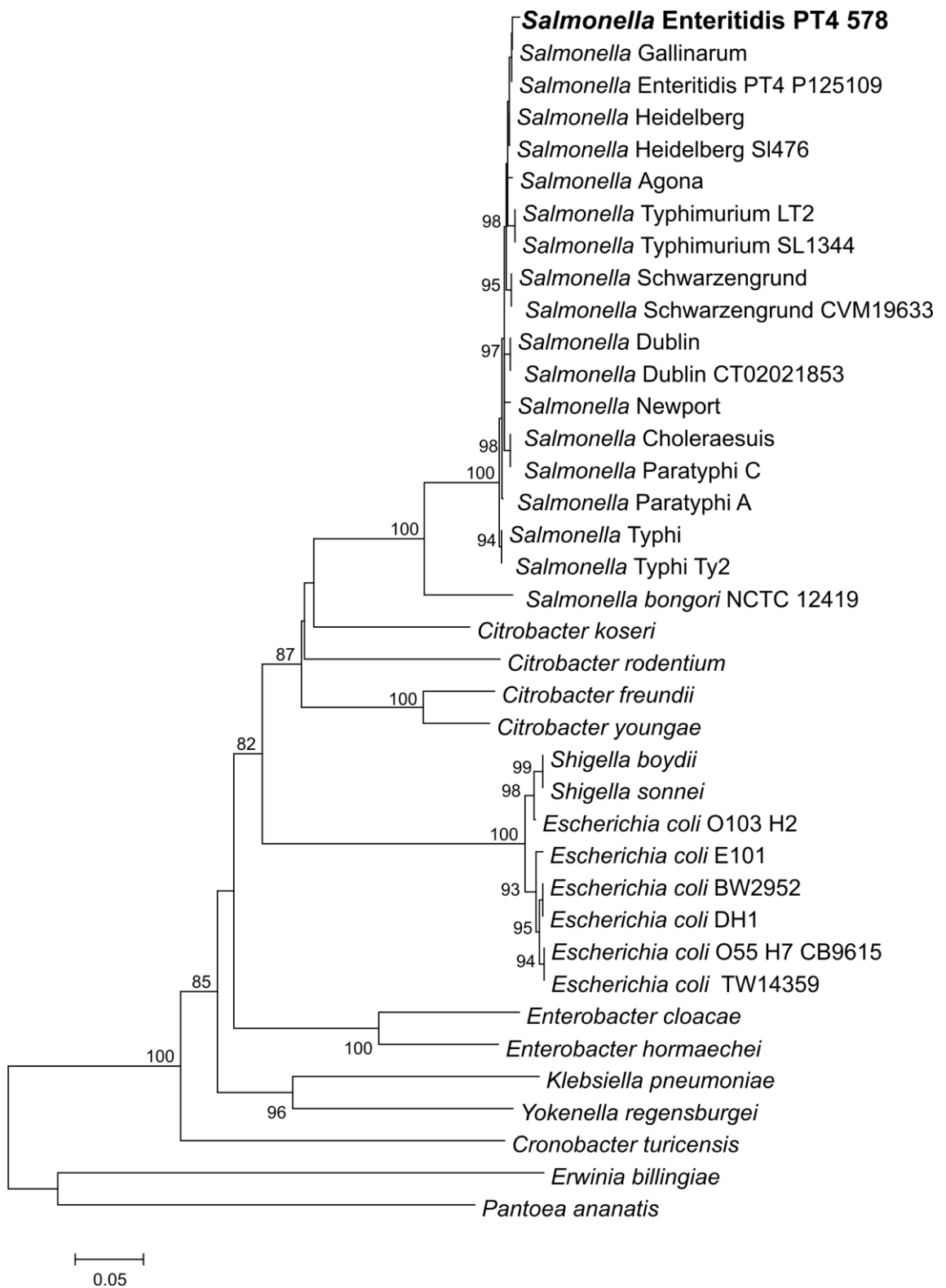


Fig. 5. Árvore filogenética obtida pelo método de Neighbor-Joining (NJ) utilizando a sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína SdiA de 37 isolados de bactérias do GenBank e do isolado de estudo *Salmonella Enteritidis PT4 578* (em realce). Ao lado de cada nó ancestral é evidenciado, da esquerda para a direita, o valor de *bootstrap* ao realizar 100000 réplicas. Valores de probabilidade abaixo de 80 % foram omitidos da árvore. O modelo de substituição foi o Kimura 2 parâmetros.

No entanto, entre os organismos de diferentes gêneros não havia uma conservação da sequência de nucleotídeos da proteína SdiA, à exceção de *Shigella* e *Escherichia* e das espécies do gênero *Citrobacter* (*C. koseri* e *C. rodentium*) que se agrupam mais próximas ao gênero *Salmonella*.

Uma explicação plausível para a conservação deste gene em ambientes de alta pressão seletiva, imposta pela competição dentre espécies e, ou gêneros de bactérias é a capacidade da proteína SdiA de detectar e responder a moléculas sinais AHLs de QS produzidas por diferentes bactérias (Case, Labbate e Kjelleberg 2008). Este comportamento poderia conferir vantagens para a bactéria, pois permite regular o aumento de virulência, como é o caso de *Salmonella* Typhimurium e a formação de biofilme por *E. coli*, ambos fenótipos extremamente importantes para suplantar a competição e infectar o hospedeiro (Case, Labbate e Kjelleberg 2008).

Embora seja desconhecido se todos os homólogos de LuxR são funcionais, sugere-se que este perfil pode ser prevalente entre as Proteobacteria, sendo que 26 % dos genomas sequenciados apresentavam circuito completo (QS completo) e 17 % (QS incompleto) com potencial de espionar o sistema QS mediado por AHLs de outras Proteobactérias (Case, Labbate e Kjelleberg 2008). Algumas das espécies escolhidas para análise filogenética também apresentam o sistema completo de QS mediado pelo AI-1, ou seja, apresentam o gene codificador da sintase (*luxI*) e o gene codificador da proteína reguladora de resposta (*luxR*). A sequência nucleotídica da proteína LuxR, pertencente ao sistema completo, apesar de ser considerada homóloga a SdiA (proteína reguladora do sistema incompleto), apresenta uma baixa identidade com a mesma, o que pode ser explicado pela maior flexibilidade da proteína SdiA em detectar e responder a moléculas sinais produzidas por outras espécies e, ou gêneros de bactérias (Gray e Garey 2001).

A capacidade de troca gênica por bactéria pode ser demonstrada pelo próprio mecanismo de QS. Ao se analisar o mecanismo de QS mediado pelo AI-1, inicialmente descrito em *V. fischeri* por Nealson e Hastings (1979) observa-se a presença de dois componentes: *luxI*, que codifica uma proteína sintase do AI-1 e *luxR* que codifica uma proteína reguladora de resposta, que agirá como fator transcricional, ativando ou reprimindo a expressão de genes (Boutlete e Whiteley 2009). Entretanto, em alguns micro-organismos este sistema é completo e este fato pode ser resultado do mecanismo de transferência horizontal de genes (Gray e Garey 2001).

Bactérias do gênero *Citrobacter* são patógenos entéricos com ação semelhante a *E. coli* enteropatogênica e apresentam o sistema QS completo formado por *croI* (*luxI*) e

croR (*luxR*) (Coulthurst et al. 2007). *Erwinia* sp. também faz parte da família das Enterobacteriaceae e apresenta espécies com sistema completo mais elucidado como o de *E. carotovora*, com mecanismo QS composto por *carI* (*luxI*) e *carR* (*luxR*). Em *Erwinia amylovora* foi detectado apenas o gene que codifica a proteína reguladora, homóloga a SdiA (Smith et al. 2008). No gênero *Pantoea* foi encontrado o sistema completo formado por *esaI* e *esaR* e por *eagI* e *eagR* (Gray e Garey 2001). No entanto, há pouca informação na literatura sobre os outros gêneros analisados, como é o caso de *Cronobacter* spp. (anteriormente *Enterobacter sakazakii*), *Klebsiella* e *Yokenella* que apresentam sistema completo e incompleto ainda pouco elucidados (Araújo et al. 2012).

4. Conclusão e Perspectivas

Salmonella Enteritidis PT4 578 apresenta sistemas QS mediados pelos AIs 1 e 2. Estes sistemas são semelhantes aos sistemas QS descritos na literatura para *Salmonella* Typhimurium. A natureza da caracterização destes sistemas é de grande valia dado que as bactérias raramente vivem em monocultura e sim em comunidades mistas. Desta maneira, a capacidade de responder ao quorum constituído por outros organismos e, conseqüentemente, alterar o transcriptoma é fundamental para sua adaptação e sobrevivência às condições impostas, principalmente quando se trata de patógenos humanos como *Salmonella* Enteritidis, que usa dos sinais emitidos por seus competidores para suplantar a defesa do hospedeiro e causar a doença.

As sequências de nucleotídeos codificadoras da proteína SdiA de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 agruparam com os outros sorovares de *S. enterica*, incluindo Typhimurium, além de agrupar com a espécie *Salmonella bongori*. Assim, fenótipos já elucidados e regulados por QS mediado por AI-1 em *Salmonella* Typhimurium poderão ser estendidos para estudos em *Salmonella* Enteritidis.

A caracterização do mecanismo de QS realizada no presente estudo para o patógeno humano *Salmonella* Enteritidis permitirá futuramente, a elucidação de novas estratégias de controle em possíveis fenótipos regulados pelos AIs-1 ou AIs-2, no qual a associação de antimicrobianos convencionais e o desenvolvimento de inibidores de quorum poderá resultar em maior controle do agente patogênico ao prevenir a formação de biofilme, suplantar a resistência à antimicrobianos ou mesmo reduzir a virulência do micro-organismo.

5. Agradecimentos

Agradecemos a agencia Brasileira financiadora, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. Referências Bibliográficas

- Ahmer BMM, Gunn J (2011) Interaction of *Salmonella* spp. with the intestinal microbiota. *Front Microbiol* 2(101): 1-9.
- Ahmer BMM, Reeuwijk J, Timmers CD, Valentine PJ, Heffron F (1998) *Salmonella* Typhimurium encodes SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J Bacteriol* 180: 1185-1193.
- Akaike H (1981) Likelihood of a model and information criteria. *J Econometrics* 16 (1): 3-14.
- Araújo FDDS, Esper LMR, Kuaye AY, Sircili MP, Marsaioli AJ (2012) *N*-Acyl-homoserine lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and their degradation by *Bacillus cereus* enzymes. *Agric Food Chem* 60: 585–592.
- Bai J, Rai R. (2011) Bacterial quorum sensing and food industry. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 10: 184-194.
- Bassler BL (2002) Small talk cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109: 421-24.
- Byrd CM, Bentley WE (2009) Quieting cross talk – the quorum sensing regulator LsrR as a possible target for fighting bacterial infections. *Cell Res* 19: 1229-1230.
- Case RJ, Labbate M, Kjerlleeg S (2008) Commentary: AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2: 345–349.
- Christensen AB, Riedel K, Eberl L, Flodgaard LR, Molin S, Gram L, Givskiv M (2003) Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiol* 149: 471-483.
- Dieppois G, Ducret V, Caille O, Perron K (2012) The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS One* 7(5): e38148.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies and approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–79.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176 (2): 269-275.
- Gray KM, Garey JR (2001) The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiol* 147: 2379-2387.
- Gunn JS (2011) *Salmonella* host-pathogen interactions: a special topic. *Front Microbiol* 2 (191): 1-2.
- Halatsi K, Oikonomou I, Lambiri M, Mandilara G, Vatapoulos A, Kyriacou A (2006) PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene sdiA. *FEMS Microbiol Lett* 259: 201-207.

- Harada ML, Schneider H, Schneider MP, Sampaio I, Czelusniak J, Goodman M (1995) DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: support for the sister-grouping of Cebus and Saimiri from two unlinked nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* 4 (3): 331-349.
- Hilbert F, Smulders FJM, Chopra-Dewasthaly R, Paulsen P (2012) Review *Salmonella* in the wildlife-human interface. *Food Res Int* 45: 603–608.
- Inhulsen S, Aguilar C, Schmid N, Suppiger A, Riedel K, Eberl L (2012) Identification of functions linking quorum sensing with biofilm formation in *Burkholderia cenocepacia* H111. *Microbiol open* doi: 10.1002/mbo3.24.
- Korbie D, Mattick JS (2008) *Touchdown* PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protocols* 3: 1452 – 1456.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinf* 9 (4): 299-306.
- Lerat E, Moran NA (2004) The evolutionary history of quorum sensing in bacteria. *Mol Biol Evol* 21: 903-913.
- March JC, Bentley WE (2004) Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotech* 15: 495-502.
- Michael B, Smith J, Swift S, Heffron F, Ahmer BMM (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR Homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* 183: 5733-5742.
- Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Ann Rev Microbiol* 55: 165-199.
- Nealson KH, Hastings JW (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev.* 43: 496-518.
- Nesse LL, Berg K, Vestby LK, Olsaker I, Djonne B (2011) *Salmonella* Typhimurium invasion HEP-2 epithelial cells in vitro is increased by *N*-acylhomoserine lactone quorum sensing signals. *Acta Vet Scand* 53: 1-5.
- Ng W, Bassler BL (2009) Bacterial quorum sensing network architectures. *Ann Rev Genet* 43: 197-222.
- O’Grady EP, Viteri DF, Sokol PM (2012) A unique regulator contributes to quorum sensing and virulence in *Burkholderia cenocepacia*. *PLOS One* 7(5): e37611.
- Ravn L, Christensen AB, Molin S, Givskov M, Gram L (2001) Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J Microbiol Met* 44: 239-251.
- Sabag-Daigle A, Soares JA, Smith JN, Elmasry ME, Ahmer BMM (2012) The acyl homoserine lactone (AHL) receptor, SdiA, of *E. coli* and *Salmonella* does not respond to indole, but at high concentrations indole can interfere with AHL detection. *Appl Environ Microbiol* doi:10.1128/AEM.00046-12.

- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JEJ, Rinehart KL, Farrand SK (1997) Detecting and characterizing *N*-acyl homoserinelactone signal molecules by thin layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci* 94: 6036-6041.
- Sitnikov DM, Schineller JB, Baldwin TO (1996) Control of cell division in *Escherichia coli*: Regulation of transcription of *ftsQA* involves both *rpoS* and *SdiA*-mediated PNAS 93 (1): 336-341.
- Smith JL, Dysze JL, Soares JA, Ellermeier CD, Altier C, Lawhon SD, Adams LG, Konjufca V, Curtiss III R, Slauch JM, Ahmer BMM (2008) *SdiA*, an *N*-Acylhomoserine lactone receptor, becomes active during the transit of *Salmonella enterica* through the gastrointestinal tract of turtles. *PLOS One* 7(3): e2826.
- Sockett PN (1991) A review: The economic implications of human *Salmonella* infection. *J App Bacteriol* 71: 289-295.
- Swift S, Downie JA, Whitehead NA, Barnard AML, Salmond GPC, Williams P (2001) Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microbial Physiol* 45: 199-270.
- Taga M.E, Miller ST, Bassler BL (2003) Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* 50: 1411-1427.
- Taga ME, Semmekhack JL, Bassler BL (2001) The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* 42: 777-793.
- Takano E, Chakraborty R, Nihira T, Yamada Y.; Bibb MJA (2001) Complex role for the gamma-butyrolactone SCB 1 in regulating antibiotic production in *Streptococcus coelicor* A3. *Mol Microbiol* 41: 1015 – 28.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
- Thomson NR et al. (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res* 18: 1624-1637.
- Williams P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiol* 153: 3923–3938.
- Walters M, Sperandio V (2006) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 296: 125-131.

CAPÍTULO 03

Autoindutor-1 de *quorum sensing* fortalece a relação entre células de *Salmonella enterica* Enteritidis PT4

Capítulo formatado segundo normas da revista

PLOS Pathogens

Resumo

O mecanismo de *quorum sensing* é usado pelas bactérias para coordenar a expressão gênica em resposta à densidade populacional e envolve a produção, detecção e resposta às moléculas sinalizadoras extracelulares conhecidas como autoindutores (AIs). *Salmonella* não sintetiza o autoindutor 1 (AI-1), as acil homoserinas lactonas (AHL), comum em bactérias gram-negativas, mas apresenta um receptor para esta molécula, o SdiA. Ainda não está evidenciado o efeito direto de SdiA na modulação de fenótipos de importância em *Salmonella*. O presente trabalho avalia a participação dos AIs-1 na indução de formação de biofilmes e na expressão de genes de virulência em condições de anaerobiose por *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 578. Foi avaliado o efeito de uma mistura de AIs-1 na concentração final de 50 nM e de cada AI-1 na mesma concentração na formação de biofilmes por *Salmonella*. Foi constatado que AIs-1 aumentam a capacidade de *Salmonella* Enteritidis formar biofilme e a AHL com cadeia acil de 12 carbonos apresentou maior interferência nesse fenótipo. A formação de biofilme mais intensa na presença de AHLs foi constatada por microscopia de varredura e microscopia confocal. Foi comprovado que C₁₂-HSL promoveu maior expressão dos genes de importância para formação de biofilmes, *lpfA*, *fimF*, *fliF*, *glgC* e de genes de virulência *hila*, *invA* e *invF*. Estes resultados evidenciam, pela primeira vez, a função do SdiA na detecção de moléculas sinais produzidas por outras bactérias gram-negativas na modulação de fenótipos importantes para a sobrevivência e virulência de *Salmonella* Enteritidis.

1. Introdução

Muito interesse tem sido demonstrado nas duas últimas décadas para elucidar o paradigma da comunicação entre bactérias, as quais mimetizam organismos multicelulares. A comunicação intercelular entre populações bacterianas é estudada como uma importante ferramenta para coordenar atividades metabólicas. O mecanismo de *quorum sensing* (QS) usado pelas bactérias para coordenar a expressão gênica em resposta à densidade populacional específica, envolve a produção, detecção e resposta a pequenas moléculas sinalizadoras extracelulares conhecidas como autoindutores (AIs) [1,2,3].

Quorum sensing tem sido estudado extensivamente em bactérias patogênicas e deterioradoras, objetivando-se elucidar mecanismos de regulação de processos infecciosos e de deterioração bacteriana de alimentos. Atividades proteolíticas, lipolíticas, quitinolíticas, pectinolíticas associadas com deterioração de alimentos, além de fenótipos associados à virulência como formação de biofilmes e supressão imunológica são reguladas por QS, dentre outros eventos fisiológicos da bactéria [4,5,6,7,8].

Entre as doenças entéricas causadas pela presença de bactérias patogênicas em alimentos, a salmonelose é a principal, sendo *Salmonella enterica* sorovares Typhimurium e Enteritidis responsáveis pela maioria das infecções na Europa e América [9,10,11].

Salmonella apresenta sistemas de QS regulados por três diferentes AIs; AI-1, AI-2 e AI-3. O sistema mediado pelo AI-1 é o mais frequentemente observado na comunicação intra-específica em bactérias gram-negativas e envolve *N*-acil homoserina lactonas (AHL) como molécula sinal [12]. Entretanto, em *Salmonella* Typhimurium, assim como em *Escherichia coli*, o sistema mediado pelo AI-1 é incompleto, pois apresenta apenas a proteína reguladora de resposta SdiA [13].

Devido à falta do gene que codifica a sintase de AHL no genoma de *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium, a hipótese de que SdiA seja utilizada para detectar apenas os sinais de outras espécies de bactérias foi comprovada por Michael e colaboradores (2001) [14].

Uma triagem genética foi realizada por Ahmer e colaboradores (1998) [13] a fim de identificar genes regulados por SdiA. Apenas quatro genes, *srgA*, *srgB*, *srgC* e *rck*, presentes no plasmídeo pSLT que codifica genes de virulência em *Salmonella* Typhimurium tiveram expressão dependente de SdiA. Análises das sequências sugerem

que *srgA* que codifica um homólogo da proteína periplasmática dissulfeto isomerase DsbA, requerida para montagem do pilus P, *srgB* codifica uma suposta lipoproteína, *srgC* codifica um suposto tipo deregulador transcricional semelhante a AraC e *rcK* codifica uma pequena proteína de membrana externa de importância para sobrevivência durante infecção em humanos. Porém, as verdadeiras funções de *srgA*, *srgB* e *srgC* ainda não foram esclarecidas [14]. Entretanto, Moretto e colaboradores (2012) [15] demonstraram que mutação no gene *sdiA* não afetou a virulência de *Salmonella* em modelos de infecção em camundongos, aves e bovinos. Sperandio (2010) [16] observou que *sdiA* não confere vantagens para colonização de *Salmonella* Typhimurium, pois SdiA não é funcional durante infecção, mas é funcional durante co-infecção com um patógeno produtor de AHL, por exemplo, *Yersinia enterocolitica*.

No sistema mediado pelo AI-2 o gene *luxS* codifica proteína que participa da síntese da molécula sinal, sendo que a expressão gênica ocorre após uma cascata de sinalização envolvendo o sistema de transporte Lsr [17]. O AI-3, juntamente com os hormônios epinefrina e norepinefrina, permite a comunicação entre bactérias e seus hospedeiros mamíferos [17]. A detecção do AI-3 pelo patógeno é dada por meio de um sistema de dois componentes formados pela quinase QseC e a proteína reguladora de resposta QseB [17,18]. A maioria dos estudos sobre QS em *Salmonella* tem como objetivo esclarecer os processos genéticos que regulam a síntese e função do AI-2. Poucos trabalhos concentram-se na capacidade do agente patogênico detectar e responder a sinalização de AIs-1 produzidos por outras espécies presentes nos alimentos, em ambientes de processamento de alimentos e no organismo hospedeiro, onde uma variedade de micro-organismos produtores de AHL podem co-existir [19].

A comunicação intercelular é usada para regular uma grande variedade de processos nas bactérias, incluindo formação de biofilme, síntese de antibióticos, indução de fatores de virulência, diferenciação celular e fluxo de nutrientes, deterioração de alimentos, dentre outros eventos fisiológicos da bactéria [4,6,20].

A formação de biofilmes por *Salmonella* é uma importante estratégia de sobrevivência em diversos ambientes, induz infecções crônicas e ainda, uma possível forma de colonizar organismos hospedeiros [9]. Os biofilmes podem ser definidos como conjuntos de micro-organismos envoltos em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas, que funcionam como um consórcio cooperativo e representam a forma de vida microbiana predominante no planeta [12,21,22].

O objetivo deste estudo é avaliar a interferência de AIs-1 na expressão de genes de virulência e na formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis PT4 em condições de

anaerobiose. Os resultados apresentados trazem uma descoberta de grande impacto por indicar um comportamento de virulência nas condições ambientais onde este patógeno intercepta e conseqüentemente decodifica a mensagem de competidores e desenvolve estratégias para sobrevivência e para vencer a competição.

2. Materiais e Métodos

Bactéria utilizada e condições de cultivo

Foi utilizada estirpe de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis fagotipo PT4 578, isolada de peito de frango, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil). O estoque das culturas foi feito em caldo Luria Bertani (LB) (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,4%) pH 7,4, contendo 33% de solução de glicerol 50% em água esterilizada e conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de cada experimento, as células foram reativadas em caldo LB, com incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 18 h em anaerobiose. A análise da interferência de AHLs foi feita ao adicionar estas moléculas sintéticas no meio de cultura em uma concentração final de 50 nM. As AHLs foram ressuspensas em acetonitrila e a adição ao meio de cultura correspondeu 1% de acetonitrila de acordo com Michael e colaboradores (2001) [14]. O mesmo volume de acetonitrila foi adicionado nos meios de cultivo do tratamento controle.

Formação de biofilme

A formação de biofilmes foi avaliada inicialmente, em microplacas de poliestireno de 96 poços, em câmara de anaerobiose de modelo estático contendo atmosfera com mistura dos gases N_2 , H_2 e CO_2 . A incubação foi a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24, 48, 72 e 96 h. Nestes períodos de incubação, a densidade óptica das células da cultura foi determinada a 600 nm e a densidade óptica das células aderidas foi determinada após coloração com cristal violeta a 0,1 % (p/v) a 590 nm em leitora de Microplacas Thermoplate Reader (molecular Devices, Califórnia, EUA) conforme método descrito por Conway e colaboradores (2002) [23]. A formação de biofilme foi avaliada em anaerobiose nos seguintes meios de cultura: Meio Mínimo de Sais (MM) e TSB na presença de diferentes AIs, quais sejam: *N*-hexanoil lhomoserina lactona (Fluka), *N*-octanoil homoserina lactona (Fluka), *N*-decanoil homoserina lactona (Sigma) e *N*-dodecanoil homoserina lactona (Fluka). Também foi avaliado o efeito do antagonista de AHL, furanonas sintéticas (Aldrich, Alemanha). Uma mistura de 3-metil-2(5H) furanona, 2-

metiltetrahydro-3-furanona, 2(5H)-furanona e 2,2-dimetil-3(2H) furanona foi preparada em acetonitrila de forma a manter a concentração final de 50 nM, sendo adicionada juntamente com *N*-dodecanoil homoserina lactona (Fluka). A formação de biofilme também foi avaliada em cupons de poliestireno, nas dimensões de 1,0 x 1,0 x 0,1 cm, com 1,0 cm² de área.

Observação dos biofilmes por microscopia

Os cupons de poliestireno foram removidos dos meios de cultivo após 36 h, enxaguados com solução fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,8 a 7,2). Em seguida foram fixados por 1 h a temperatura ambiente com solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 0,05 M. Posteriormente, foram lavados com tampão fosfato de sódio 0,05 M por seis vezes por períodos de tempo de 10 min cada. Seguiu-se a etapa de desidratação com etanol 35%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100%, 100%, durante 10 min cada. Em seguida, foi feita a secagem ao ponto crítico no Bal-Tec CPD 30, metalização em Sputter Coater SCD 010 (Balzers) e observação no microscópio eletrônico de varredura (LEO, modelo VP 1430). Também foi feita observação de biofilmes em cupons de poliestireno após cultivo de *Salmonella* Enteritidis PT4 em condições de anaerobiose em microscópio confocal LSM 510 Meta. Após 36 h de incubação, os cupons de poliestireno foram lavados com tampão fosfato de sódio 0,05 M, deixados a temperatura ambiente até secagem e, em seguida, corados com diacetato de fluoraceína por 15 min e novamente lavados com tampão fosfato de sódio 0,05 M, para posterior visualização.

Avaliação da expressão gênica

A cultura de *Salmonella* Enteritidis foi reativada em caldo LB incubada a 37 °C em anaerobiose, até atingir população de 10⁵ UFC ml⁻¹ quando, então, foi adicionado C₁₂-HSL em concentração final de 50 nM. À cultura controle foi adicionado o mesmo volume de acetonitrila. A cultura foi incubada novamente por 2 e 7 h. Após período de incubação, a cultura foi centrifugada para obtenção da biomassa total e posterior extração de RNA total. As células foram homogeneizadas com 1 ml de Trizol por 30 s em vortex e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio por ml de Trizol seguido de homogeneização manual por 15 s, incubação por 2 min à temperatura ambiente e posterior centrifugação a 12.000 g, 4 °C por 15 min para separação das fases hidrofílica e hidrofóbica. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 ml, adicionado de 5.000 µl de

isopropanol, incubado por 10 min à temperatura ambiente para precipitação do RNA e centrifugado a 12.000 g, 4°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao microtubo foram adicionados 1 ml de etanol gelado (75 %), homogeneizado em vortex e centrifugado a 7.500 g, 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o RNA total precipitado foi deixado secar ao ar para adição de água Mili-Q autoclavada para solubilização do RNA extraído. A concentração do RNA total foi avaliada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm para cálculo da razão 260/280. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v). O RNA total foi purificado para eliminação do DNA. A partir de 1 µg de RNA a síntese da primeira fita do cDNA foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante da *Improm IITM reverse Transcription System* (Promega). O RT-qPCR foi realizado numa reação com volume de 10 µl contendo 0,2 µl do molde de cDNA, 0,5 µM dos respectivos oligonucleotídeos, 12,5 µl *SYBR Green* e 9 µl de água Mili-Q autoclavada. A reação foi realizada com o primeiro passo a 50 °C por 2 min, segundo passo de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Os produtos de amplificação foram em torno de 100 pb. Todas as amplificações foram realizadas em grades ópticas em placas de 96 poços no sistema detector de sequência Bio-Rad C1000 Manager. Os dados de fluorescência foram processados usando o *software* Bio-Rad CFX Manager, resultando em valores-limite de ciclo para cada amostra. Este experimento foi realizado com três repetições independentes e cada amostra foi avaliada em triplicata. As dosagens gênicas foram obtidas pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e a subunidade da DNA girase foi utilizada como controle endógeno para corrigir as dosagens dos genes de interesse, sendo o tratamento controle usado como alvo.

Análise estatística

Os resultados obtidos na detecção de formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis PT4 em diferentes meio de cultura e na presença dos diferentes AIs-1 foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey. Para análise da expressão gênica foi feita análise estatística pelo teste t de Student. Valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos e todas as comparações foram feitas usando o software GraphPad Prism 5.00 (GraphPad *Software*, San Diego, California, USA).

3. Resultados

Formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis PT4 em diferentes meios de cultura na presença de AIs-1

Durante o período de até 96 h em que se acompanhou a formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis PT4 em anaerobiose, maior adesão foi constatada quando o cultivo foi em TSB, meio nutricionalmente mais rico e complexo do que o meio mínimo de sais (Figura 1A-D). A adesão foi estimada calculando-se a razão entre a absorvância do extrato do cristal violeta e a densidade óptica das células totais e, desta forma, o resultado não tem a interferência do número de células planctônicas. Ficou evidenciado que a adição de 50 nM de cada uma das AHLs variando de C₆ a C₁₂ exerceu efeito estimulador significativo ($p < 0,05$) na adesão das células à superfície do poliestireno e, dentre as AHLs avaliadas, a C₁₂ apresentou maior indução deste fenótipo a partir de 72 h de incubação (Figura 1).

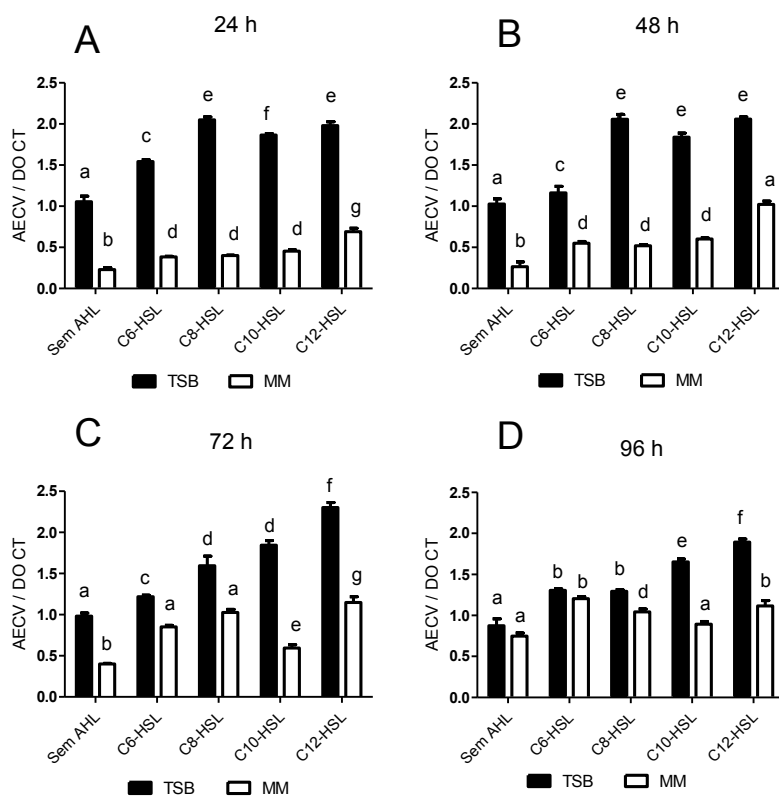


Figura 1. Razão entre a densidade óptica do extrato do cristal violeta e a densidade óptica das células totais da cultura de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 cultivadas em meios MM e TSB, com adição de diferentes AHLs na concentração de 50 nM e sem AHL após incubação a 37 °C. Por 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) e 96 h (D), em anaerobiose. O biofilme foi avaliado dividindo-se a absorvância do extrato do cristal violeta (AECV) pela densidade óptica das células (CT). Valores com diferentes letras são estatisticamente diferentes a $p < 0,05$. Os dados representam a média (desvio padrão) de experimentos em triplicata.

Efeito de AI-1 na adesão de células de *Salmonella Enteritidis* PT4

A microscopia eletrônica de varredura permitiu caracterizar o processo de adesão e formação de biofilme por *Salmonella Enteritidis* PT4 nas condições estudadas, ou seja, na ausência e presença dos AIs-1 (Figura 2). O caldo TSB foi escolhido para caracterizar a interferência de AIs por se tratar do meio de cultura que resultou em maior adesão celular.

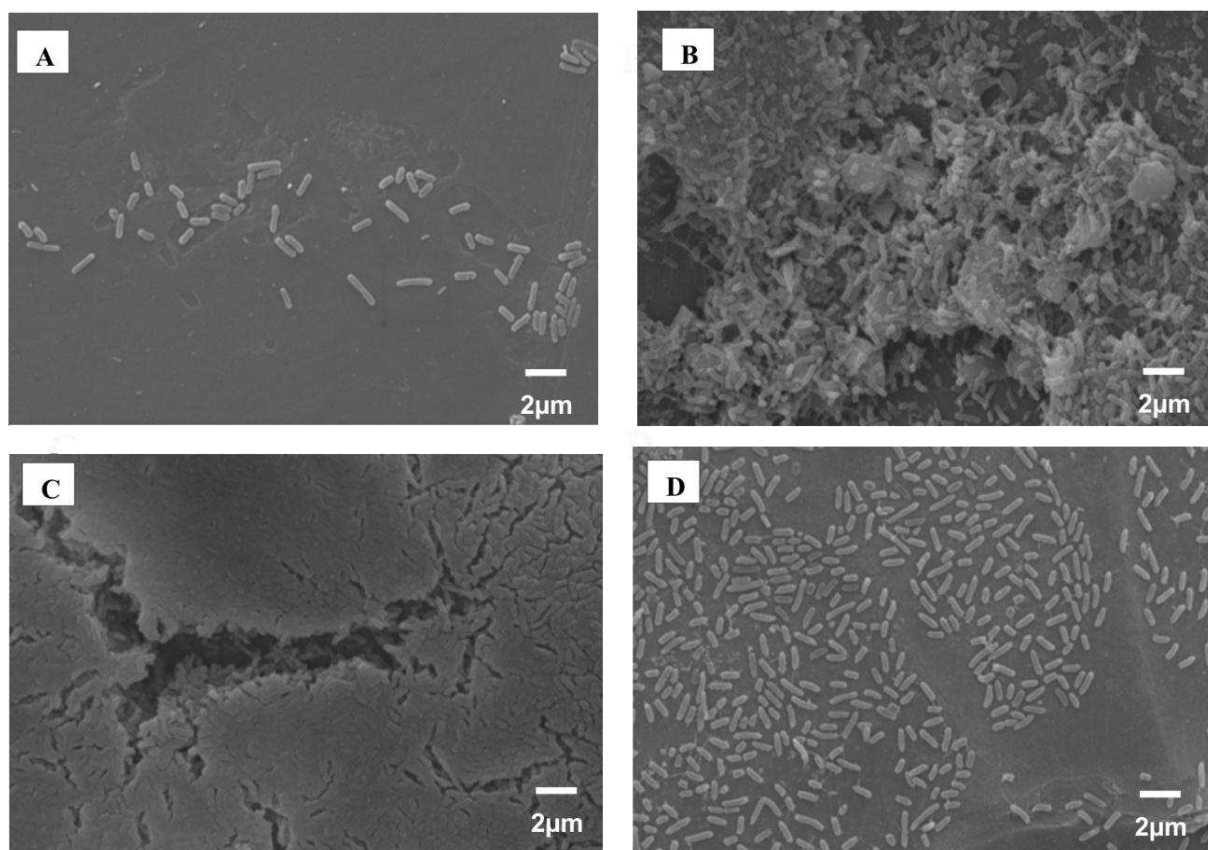


Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados por *Salmonella Enteritidis* PT4 578 em cupons de poliestireno em meio TSB. Sem AHL (A), na presença de mix-AHL (B), C₁₂-HSL (C) e C₁₂-HSL acrescido de mix-furanona (D), os AIs-1 foram adicionados na concentração final de 50 nM, em condição de anaerobiose por 36 h de incubação.

Não foi possível observar estruturas típicas de biofilme na superfície de poliestireno imerso na cultura de *Salmonella* após 36 h de incubação em meio de cultura não adicionado de AI-1 (Figura 2A). Nesta condição, foi possível notar apenas adesão de poucas células com espaçamento entre elas. A ocorrência de adesão de grande número de células nos cupons de poliestireno após 36 h de incubação foi observada ao

adicionar ao meio de cultura, uma mistura contendo de C₆ a C₁₂-HSLs, sendo possível notar presença de exopolissacarídeo (Figura 2B). Entretanto, a presença de apenas C₁₂-HSL resulta em células mais agregadas e morfologia característica de biofilme (Figura 2C).

As imagens evidenciam que C₁₂-HSL induz a formação de estruturas de biofilme compacto (Figura 2C) e, nesta condição, os biofilmes permaneceram estáveis por 96 h (dados não mostrados). Pela observação das imagens é possível notar regiões com multicamadas de células que caracterizam a presença de microcolônias comuns nos biofilmes bacterianos.

Na tentativa de se comprovar a regulação do fenótipo de formação de biofilme pelo AI-1, foi avaliada a adesão celular na presença de uma mistura de furanonas. Furanonas são metabólitos originalmente isolados da alga *Delisea pulchra* e, por serem análogas de AHLs, concorrem com estes para se ligarem a SdiA, mas são incapazes de promoverem a regulação gênica. A presença da mistura de furanonas, juntamente com C₁₂-HSL resultou em células aderidas, com maior espaçamento entre elas, porém não foi observada estrutura típica de biofilme (Figura 2D). Todavia, mesmo na presença desse inibidor de QS foi possível notar maior número de células aderidas (Figura 2D) ao se comparar ao controle (Figura 2A).

A observação direta das populações microbianas é necessária para obter informações exatas da dinâmica populacional, organização estrutural do biofilme, portanto outra técnica de microscopia, a eletrônica confocal, foi utilizada a fim de caracterizar a interferência dos AIs-1 na formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis PT4. Nas imagens obtidas pela microscopia confocal, confirmou-se o efeito de AHLs na estimulação da formação de biofilme por *Salmonella* em cupons de poliestireno, em condições de anaerobiose (Figura 3).

A adesão de células de *Salmonella* é escassa na ausência de AHLs (Figura 3A), e estruturas compactas, caracterizando microcolônias e aglomerados celulares são visualizados quando AHLs são adicionadas (Figura 3B). É evidente o efeito que a C₁₂-HSL tem na estimulação do desenvolvimento de biofilme compacto e maduro ao final de 36 h de incubação (Figura 3C). A diferença de intensidade da fluorescência do corante nas diferentes condições de cultivo observada por microscopia confocal (Figura 3) permite supor maior agregado celular e multicamadas na presença de C₁₂-HSL (Figura 3C).

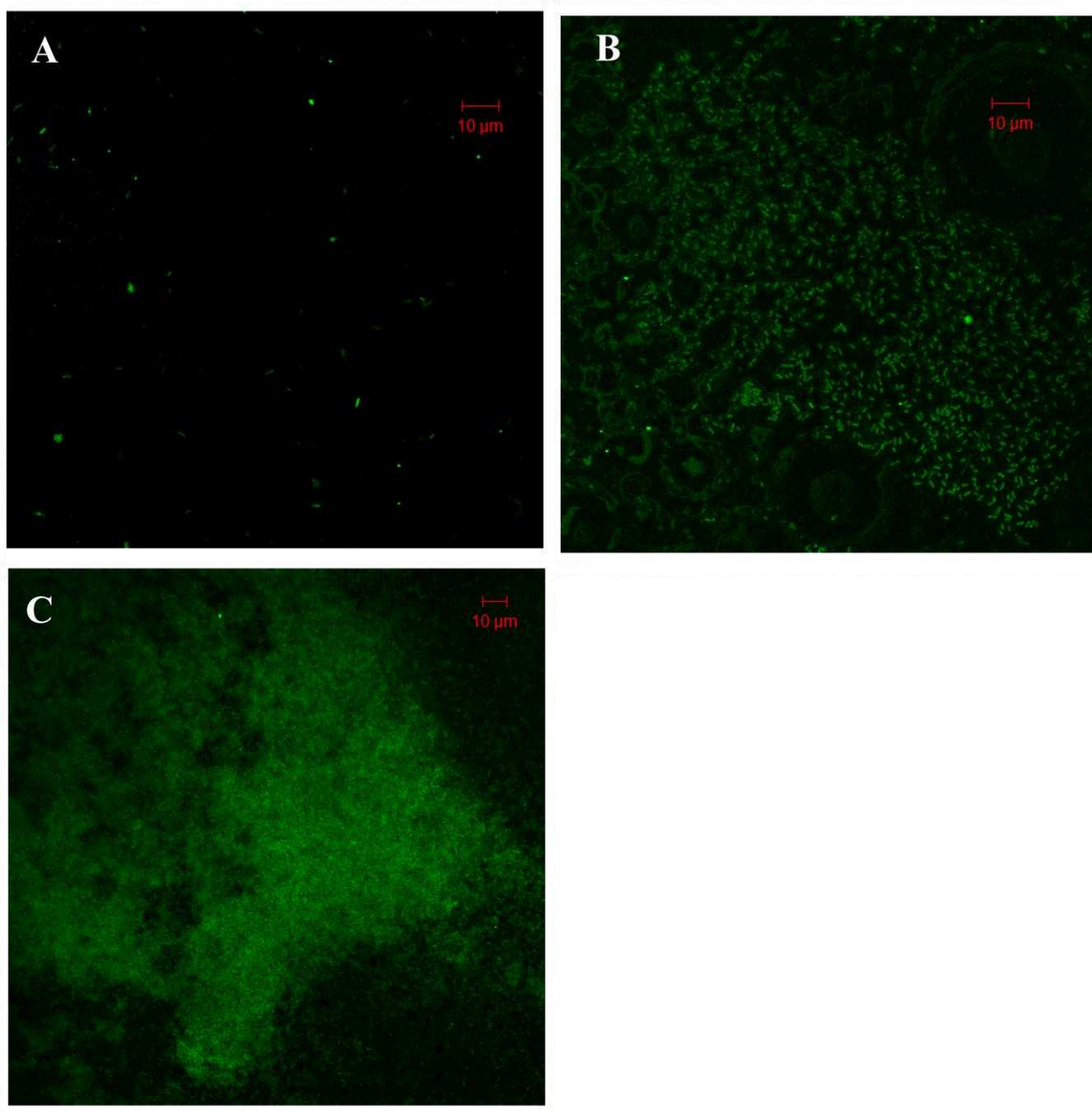


Figura 3. Imagens de microscopia eletrônica confocal de biofilmes formados por *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em cupons de poliestireno em meio TSB. Sem AHL (A), na presença de mix-AHL (B), C₁₂-HSL (C), os AIs-1 foram adicionados na concentração final de 50 nM, em condição de anaerobiose por 36 h de incubação.

Análise da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme por RT-qPCR

A figura 4 apresenta a expressão gênica relativa dos genes *glgC*, *fliF*, *lpfA* e *fimF* de *Salmonella* Enteritidis PT4 após incubação com C₁₂-HSL por 2 (Figura 4A) e 7

h (Figura 4B). A cultura de *Salmonella* Enteritidis PT4 foi usada como controle e o gene *gyrA* como controle endógeno. A linha tracejada nos gráficos (Figura 4) ilustra a expressão dos genes avaliados, equivalente a 1 no controle.

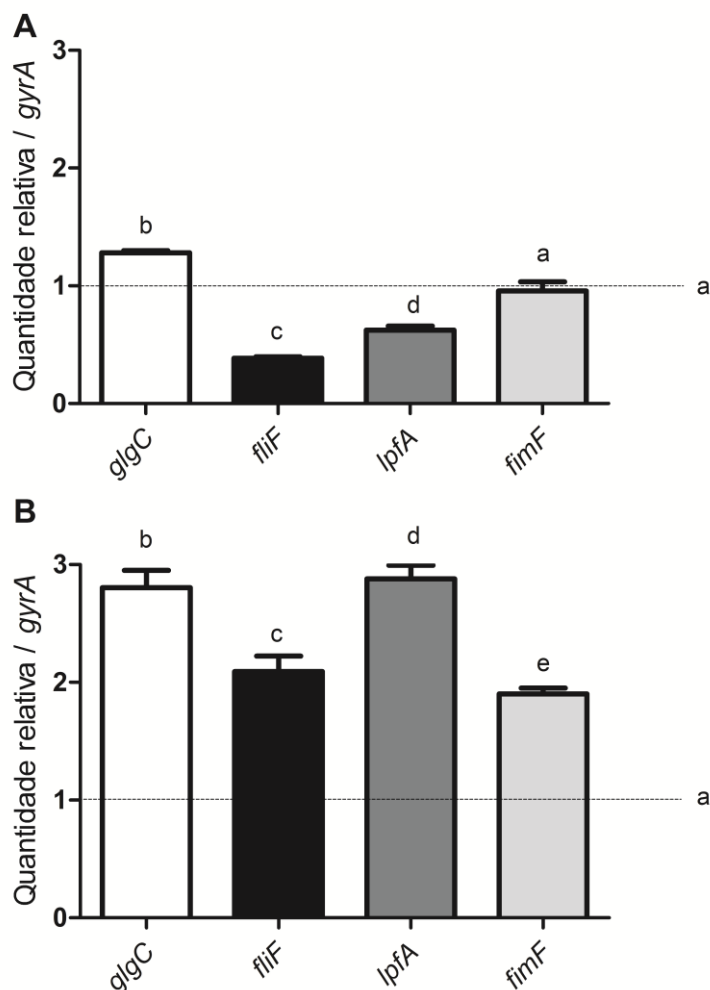


Figura 4. Expressão gênica relativa dos genes envolvidos para formação de biofilme, *glgC*, *fliF*, *lpfA* e *fimF* de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em TSB a 37 °C. Após atingir fase logarítmica foi exposta a 2 h (A) e 7 h (B) de contato com C₁₂-HSL na concentração final de 50 nM. Valores com diferentes letras são estatisticamente diferentes a $p < 0,05$, comparados ao controle (linha tracejada). Os dados representam a média (desvio padrão) de experimentos em triplicata.

A adição de C₁₂-HSL aumentou a expressão do gene *glgC*, responsável pela regulação da biossíntese de glicogênio, de maneira proporcional ao aumento do período de incubação (Figura 4).

Entretanto, embora a expressão dos genes relacionados com função motora, como *fliF*, e com fímbrias como *lpfA* e *fimF* tenha sido reduzida após 2 h de contato com C₁₂-

HSL, observou-se aumento expressivo ($p < 0,05$) e maior do que duas vezes a expressão, após 7 h de incubação na presença de AI-1 C₁₂-HSL (Figura 4).

A adição de C₁₂-HSL resultou em uma aumento da expressão ($p < 0,05$) do gene *glgC* após 2 e 7 h de contato, sendo que o período mais longo de incubação resultou em uma aumento da expressão gênica de quase duas vezes mais do que o controle ($p < 0,05$) (Figura 4).

Análise da expressão de genes de virulência por RT-qPCR

A expressão dos genes de virulência *hilA*, *invA* e *invF* avaliados, pertencentes à ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI-1), não foi alterada em relação ao controle ao final de 2 h de incubação na presença de C₁₂-HSL (Figura 5A). Entretanto, aumentos significativos ($p < 0,05$) de até 3,5 vezes na expressão destes genes foram registrados na presença de C₁₂-HSL com aumento do período de incubação para 7 h (Figura 5B).

4. Discussão

Nas indústrias de alimentos, medidas de higiene são adotadas para manter a prevalência de *Salmonella* spp. em baixos níveis, porém falhas nas rotinas resultam na contaminação por *Salmonella* em equipamentos ou em outras superfícies, gerando maior número de surtos [15]. Para adoção de estratégias de controle de biofilmes, é necessário o conhecimento das condições que afetam a formação dessas estruturas.

A formação de biofilmes bacterianos em laboratório é difícil, pois os meios comumente empregados nos cultivos possuem muitos nutrientes. Na indústria de alimentos, os micro-organismos buscam capturar a matéria orgânica aderida nas superfícies de processamento, o que resulta na adesão celular e iniciação do processo de formação do biofilme [24]. A avaliação de formação de biofilme em condição de anaerobiose foi escolhida por simular o ambiente intestinal e difere da maioria dos estudos que avaliam a formação de biofilme em aerobiose. O efeito da composição nutricional do meio e das condições ambientais sobre a formação de biofilmes afetam a formação dos mesmos e, o presente trabalho mostrou que o meio complexo combinado com condição de anaerobiose, induziu maior adesão de *Salmonella* Enteritidis PT4. Resultados encontrados na literatura são contraditórios e, enquanto alguns autores registraram que meios ricos aumentam a formação de biofilmes bacterianos [25,26], outros consideram que condições de estresse nutricional encontrados em alguns meios mínimos estimulam a adesão e,subseqüentemente, formação de biofilme por bactérias [21,26,27].

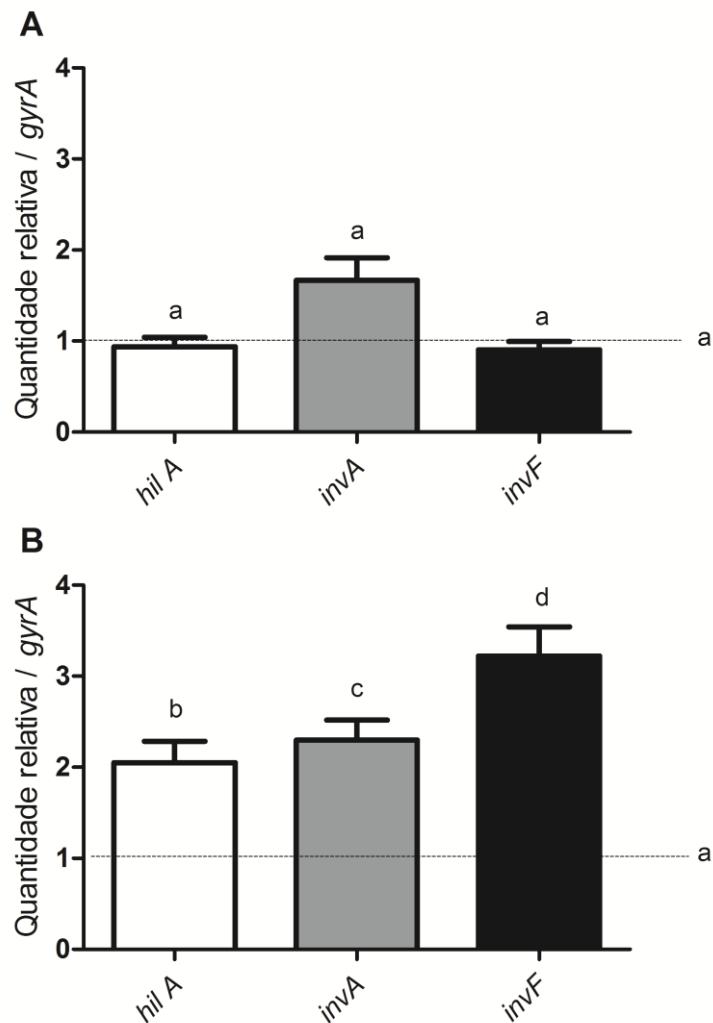


Figura 5. Expressão gênica relativa dos genes de virulência, *hilA*, *invA*, e *invF* de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em TSB a 37 °C. Após atingir fase logarítmica foi exposta a 2 h (A) e 7 h (B) de contato com C₁₂-HSL na concentração final de 50 nM. Valores com diferentes letras são estatisticamente diferentes a $p < 0,05$, comparados ao controle (linha tracejada). Os dados representam a média (desvio padrão) de experimentos em triplicata.

A formação de biofilme por muitas bactérias está relacionada com o sistema QS mediado pelas AHLs, mas esta constatação ainda não havia sido feita para *Salmonella* Enteritidis. Em bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* [28], *Burkholderia cepacia* [29], *Aeromonas hydrophila* [30], *Agrobacterium tumefaciens* [31] e *Hafnia alvei* [27] o efeito de AHLs na formação do biofilme foi constatado.

Em publicações recentes, é relatada que a função da proteína receptora de AHLs em *Salmonella*, a SdiA, permanece desconhecida [32,33]. Portanto, este estudo é o

primeiro relato da interferência de AI-1 na formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis demonstrando como este patógeno pode reagir a moléculas indutoras produzidas por outras bactérias.

Dentre as AHLs avaliadas, a C₁₂-HSL foi a que se destacou em promover a formação de biofilme mais compacto e maduro. A maior efetividade de moléculas de cadeia carbônica longa em fenótipos de virulência foi relatada por Rumbaugh e colaboradores (2000) em *P. aeruginosa* [34]. Essa molécula foi descrita com destaque para comunicação entre reinos, ou seja, células eucarióticas e células procarióticas [35]. Além disso, AHLs variando de 11 a 13 carbonos apresentam atividade supressiva no sistema imune de mamíferos [35,36].

A comprovação da mudança no estilo de vida de *Salmonella* Enteritidis PT4 na presença de C₁₂-HSL em condição de anaerobiose mostra a possibilidade desse patógeno desenvolver estratégias para sobrevivência e tornar-se mais competitivo a partir da sinalização produzida por bactérias competidoras. Supondo-se o ambiente intestinal, com uma microbiota abundante e diversificada, é possível considerar que *Salmonella* possa perceber a presença de sinais produzidos por bactérias competidoras e modificar o comportamento, como a formação de biofilmes, para garantir sua persistência no ambiente.

O presente trabalho comprova que C₁₂-HSL interfere no comportamento de *Salmonella* Enteritidis PT4 tanto pelas imagens de microscopia eletrônica que mostram a formação de biofilme quanto pela análise da expressão gênica, que mostra aumento da expressão de genes envolvidos na formação de biofilme na presença deste AI-1. A expressão gênica pode ser significativamente alterada quando as células bacterianas formam o biofilme, resultando em fenótipos diferenciados após a adesão à superfície [20,37].

Existe grande interesse em desenvolver sistemas para interromper ou manipular o processo de sinalização célula-célula em bactérias, utilizando-se compostos análogos ou antagonistas de QS ou, ainda, enzimas que degradem as moléculas sinalizadoras, a fim de alterar comportamentos regulados por QS. A aplicação desses antagonistas poderia ser útil para controlar o crescimento ou inibir os mecanismos de virulência das bactérias em diferentes ambientes, incluindo os alimentos [38,39].

Uma das formas de comprovar a inibição da comunicação se faz por meio da adição de moléculas análogas às AHLs, como as furanonas. Essas substâncias podem ligar-se à proteína LuxR e às suas homólogas sem ativá-las, ou mesmo promover a degradação dessas proteínas, e assim, impedir a transcrição de genes envolvidos na

regulação da formação dos biofilmes [40,41]. No presente trabalho, as furanonas inibiram a formação de biofilme maduro, mas não inibiram a adesão. Este resultado indica que as AHLs podem regular etapas subsequentes da formação do biofilme ou ineficácia das furanonas devido às características químicas inerentes destas moléculas, como comprimento da cadeia carbônica.

A indução acentuada da expressão de genes relacionados com a biossíntese de glicogênio, como *glgC*, que codifica uma enzima regulada alostericamente que catalisa a conversão de glicose-1-fosfato em ADP-glicose pela presença de C₁₂-AHL, pode favorecer a formação de biofilme. A regulação da biossíntese de glicogênio em *E. coli* e *Salmonella* está altamente interligada com grande variedade de processos celulares e envolve um conjunto complexo de fatores que são ajustados para o estado fisiológico da célula, dentre eles, a formação de biofilmes [42].

O aumento da expressão dos genes *fliF*, *lpfA* e *fimF* na presença de C₁₂ AHL pode também estar relacionado com a maior capacidade de formação do biofilme. O gene *fliF* está presente no operon *fliFGHIJK* e codifica uma proteína de 61 KDa pertencente ao corpo basal do flagelo, responsável pela função motora [44,45]. Os genes *lpfA* e *fimF* fazem parte de operons que codificam fímbria do tipo longa e fímbria do tipo 1 [46], respectivamente. Estas estruturas tem importância no processo de adesão de patógeno à superfícies e na interação bactéria-hospedeiro, na colonização e invasão de células intestinais, na persistência ambiental e na formação de biofilmes [46].

O aumento da expressão de genes presentes na SPI-1 de *Salmonella Enteritidis* PT4, após 7 h de incubação na presença de C₁₂-HSL indica um efeito regulador de AI-1 na virulência deste patógeno. O operon *hilABCD*, presente na SPI-1, codifica proteínas reguladoras, dentre elas, HilA que atua como regulador central da expressão dos genes relacionados à invasão de *Salmonella* a célula hospedeira [43,47,48].

O mecanismo pelo qual *Salmonella* spp. invade as células hospedeiras é bastante complexo. A bactéria promove sua internalização por meio de estimulação de células fagocíticas. Um dos genes envolvidos nesse processo é o gene *invA* que está localizado no operon *invABCD*, presente na SPI-1. Este gene codifica a proteína InvA da membrana periplasmática da bactéria, sendo essencial para a invasão das células epiteliais do hospedeiro [49].

A expressão de genes presentes na SPI-1 e próximos que codificam proteínas efetoras translocadas estão sob controle da proteína reguladora InvF, membro da família AraC/XylS de ativadores transcricionais que, juntamente com um complexo de proteína chaperona SicA regulam a expressão de diversos genes [45,50,51]. O gene *invF* é

regulado pela proteína HilA que, é codificada por um gene do operon *hil* da SPI-1. HilA, portanto, atua como regulador central [45,51].

Os resultados apresentados são inéditos, pois demonstram que AIs-1 podem interferir na formação de biofilme e expressão de genes da SPI-1 de *Salmonella*. Tais resultados contribuem para o direcionamento de pesquisas que possam trazer mais informações sobre os mecanismos de comunicação interespécie e futuramente, elaborar estratégias para prevenção de formação de biofilmes por este patógeno. O conhecimento da regulação de virulência é outra abordagem importante, pois pode conduzir a procedimentos ou terapias para reduzir o potencial patogênico desta bactéria.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa e a agência financiadora CNPq.

6. Referências Bibliográficas

1. Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Brett B (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol* 156: 2271–2282.
2. Darch SE, West SA, Winzer K, Diggle SP (2012) Density-dependent fitness benefits in quorum sensing bacterial populations. *PNAS* 109: 8259-8263.
3. Patankarl AV, González JE (2009) Review: Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol Rev* 33: 739–756.
4. Bai J, Rai R (2011) Bacterial quorum sensing and food industry. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 10: 184-194.
5. Williams P, Camara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12: 182-192.
6. Nesse LL, Berg K, Vestby LK, Olsaker I, Djonne B (2011). *Salmonella* Typhimurium invasion HEp-2 epithelial cells *in vitro* is increased by *N*-acylhomoserine lactone quorum sensing signals. *Acta Vet Scand* 53: 1-5.
7. Pinto UM, Viana ES, Martins ML, Vanetti MCD (2007) Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control* 18: 1322-1327.
8. Ponce AR, Martins ML, Araújo EF, Mantovani HC, Vanetti MCD (2012) Proteolytic activity and biofilm formation by *Enterobacter cloacae* with quorum sensing quenching by the AiiA protein. *Curr Microbiol in press*.
9. Hermans K, Nguyen TLA, Roberfroid S, Schhoofs G, Verhoven T, Coster DD, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJ (2011) Gene expression analysis of monospecies *Salmonella* Typhimurium biofilms using differential fluorescence induction. *J Microbiol Meth* 84: 467–478.
10. O’regan E, Quinn T, Frye JG, Pages SP, Porwollik S, Fedorka-Cray PJ, McClelland M, Fanning S (2010) Fitness costs and stability of a high-level ciprofloxacin resistance phenotype in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: reduced infectivity associated with decreased expression of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 genes. *Antimicrob Agents Chem.* 54: 367-374.
11. Suar M, Periaswamy B, Songhet P, Misselwitz B, Muller A, Kappeli R, Kremer M, Heikenwalder M, Hardt W (2009) Accelerated type III secretion system 2-dependent enteropathogenesis by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4/6 strain. *Inf Immun* 77: 3569-3577.
12. Simões M, Simões LC, Vieira MJ (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Sci Tech* 43: 573-583.

13. Ahmer BMM, Reeuwijk J, Timmers CD, Valentine PJ, Heffron F (1998) *Salmonella* Typhimurium encodes SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. J Bacteriol 180:1185-1193.
14. Michael B, Smith J, Swift S, Heffron F, Ahmer BMM (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR Homolog that detects mixed microbial communities. J Bacteriol 183: 5733-5742.
15. Moretro T, Heir E, Nesse LL, Vestby LK, Langsrud S (2012) Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. Food Res Int 45: 532-544.
16. Sperandio V (2010) Commentaries – SdiA bridges chemical signaling between *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Yersinia enterocolitica* in mice. J Bacteriol 192: 21-22.
17. Sperandio V, Torres A G, Kaper J B (2002) Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QscBC): a novel two component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. Mol Microbiol 43: 809-821.
18. Walters M, Sperandio V (2006) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Int J Med Microbiol 296: 125-131.
19. Dourou D, Ammor MS, Skandamis PN, Nychas GE (2011) Growth of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in the presence of quorum sensing signalling compounds produced by spoilage and pathogenic bacteria. Food Microbiol 28: 1011-1018.
20. March JC, Bentley W.E (2004) Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. Curr Opin Biotech 15: 495-502.
21. McDougald D, Rice AS, Baurrud N, Steinberg PD, Kjelleberg S (2012) Review: Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. Nat Rev Microbiol 10: 39-50.
22. Xavier K B, Bassler BL (2005) Regulation of uptake and processing of the quorum sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. J Bacteriol 187: 238-258.
23. Conway BD, Venu V, Speert DP (2002) Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. J Bacteriol 184: 5678-5685.
24. Poulsen LV (1999) Microbial biofilm in food processing. Leb Wiss Technol 32: 321-326.
25. Stepanovic S, Irkovic IC, Ranin L, Vlahovic MS (2004) Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. Lett Appl Microbiol 38:428–432.
26. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res 66(2): 86–92.

27. Viana EDS, Campos MEM, Ponce AR, Mantovani HC, Vanetti MCD (2009) Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. *Biol Res* 42: 427-436.
28. De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C (2001) Quorum sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 67: 1865-1873.
29. Huber B, Riedel K, Hentzer M, Heydorn A, Gotschlich A, Givskov M, Mpolin S, Eberl L (2001) The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiol* 147: 2517-2528.
30. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil W, Dodd CER, Williams P (2002) The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol* 4: 18-28.
31. An D, Danhorn T, Fuqua C, Parsek MR (2006) Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm co cultures. *Proc Nat Acad Sci USA* 103: 3828-3823.
32. Sabag-Daigle A, Soares JA, Smith JN, Elmasry ME, Ahmer BMM (2012) The acyl homoserine lactone (AHL) receptor, SdiA, of *Escherichia coli* and *Salmonella* does not respond to indole, but at high concentrations indole can interfere with AHL detection. *Appl Environ Microbiol* doi:10.1128/AEM.00046-12 *in press*.
33. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJD (2012) *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int* 45: 502-531.
34. Rumbaugh KP, Griswold JÁ, Hamood NA (2000) Review The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect* 2: 1721-1731.
35. Hughes D, Sperandio V (2008) Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* 6: 111-120.
36. Jakubczyk D, Barth C, Kubas A, Anastassacos F, Koelsch P, Fink K., Schepers U, Brenner-Wei G, Brase S (2012) Deuterium-labelled *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs)—inter-kingdom signalling molecules—synthesis, structural studies, and interactions with model lipid membranes. *Anal Bioanal Chem*. 403: 473-482.
37. Xu H, Lee H, Ahn J (2010) Growth and virulence properties of biofilm-forming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium under different acidic conditions. *Appl Environ Microbiol* 76: 7910–7917.
38. Pillai SD, Jesudhasan PR (2006) Quorum sensing: how bacteria communicate. *Food Technol* 60 (4): 42-50.
39. Smith JL, Fratamico PM, Novark J S (2004) Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *J Food Protect* 67: 1053-1070.

40. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Hoiby N, Klemm L, Givskov M (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol* 148: 87-102.
41. Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, Christophersen C, Steinberg P, Klemm L, Givskov M (2000) How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG 1. *Microbiol* 146: 3237-3244.
42. Mórán-Zorzano MT, Casajus NA, Muñoz FJ, Viale AM, Fernandez EB, Eydallin G, Pouzueta-Romero J (2007) Occurrence of more than one important source of ADP glucose linked to glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *FEBS Lett* 581: 4423-4429.
43. Gerlach RG, Jackel D, Geymeier N, Hensel M (2007) *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Inf Immun* 75: 4697-470.
44. Vernikos GS, Parkhill J (2006) Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinf* 22: 2196-2203.
45. Kihara M, Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM (2001) Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export apparatus. *J Bacteriol* 183: 1655-1662.
46. Grzymajlo K, Kuzminska-Bajor M, Jaworki J, Dobryszcki P, Ugorski M (2010) The high-adhesive properties of the FimH adhesin of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis are determined by a single F118S substitution. *Microbiol* 56: 1738-1748.
47. Lim S, Yun J, Yoon H, Park C, Kim B, Jeon B, Kim D, Ryu S (2007) MIC regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression via *hile* repression. *Nuc Ac Res* 35: 1822-1832.
48. Troxell B, Sikes L, Fink RC, Vazques-Torres A, Jones-Carson J, Hassan HM (2011) Fur negatively regulates *hms* and is required for the expression of HilA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 193: 497-505.
49. Oliveira SD, Rodenbuschi CR, Michael GB, Cardoso MIR, Canal CW, Brandelli A (2003) Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. *Braz J Microbiol* 34: 123-124.
50. Darwin KH, Miller VL (2000) The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella typhimurium* virulence genes. *Mol Microbiol* 35(4): 949-959.
51. Eydallin G, Moran-Zorzano T, Muñoz FJ, Baroja-Fernandez E, Montero M, Alonso-Casajus N, Viale AM (2007) An *Escherichia coli* mutant producing a truncated inactive form of GlgC synthesizes glycogen: further evidences for the occurrence of various important sources of ADPglucose in enterobacteria. *FEBS Lett* 581: 4417-4422.

CONCLUSÕES GERAIS

Salmonella Enteritidis PT4 apresenta sistemas QS mediados pelos AIs 1 e 2 semelhantes aos sistemas QS descritos em *Salmonella* Typhimurium. As sequências de nucleotídeos codificadoras da proteína SdiA de *Salmonella* Enteritidis PT4 agruparam com os outros sorovares de *S. enterica*, incluindo Typhimurium. Assim, fenótipos já elucidados e regulados por QS mediados por AI-1 em *Salmonella* Typhimurium poderão ser estendidos para estudos em *Salmonella* Enteritidis.

A presença de AHLs, particularmente, C₁₂-HSL induziu, em condições de anaerobiose, a formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis PT4 em superfície de poliestireno.

O efeito inibitório das furanonas na formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis PT4 e o aumento da expressão dos genes *glgC*, *fimF* e *fliF* na presença de C₁₂-HSL, demonstraram que este fenótipo é regulado pelo sistema QS. A presença de AI-1 aumenta a expressão dos genes de virulência *invA*, *invF* e *hilA*.

Os resultados apresentados são inéditos, pois demonstram, que AIs-1 podem interferir na formação de biofilme e expressão de genes da SPI-1 de *Salmonella* Enteritidis. Tais resultados contribuem para o direcionamento de pesquisas que possam trazer mais informações sobre os mecanismos de comunicação interespecie e futuramente, elaborar estratégias para prevenção de formação de biofilmes por este patógeno.