

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**INFLUÊNCIA DO *QUORUM SENSING* NA FORMAÇÃO
DE BIOFILME E NO PERFIL DE EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS DE *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis**

Felipe Alves de Almeida

Magister Scientiae

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A447i
2014 Almeida, Felipe Alves de, 1988-
Influência do *quorum sensing* na formação de biofilme
e no perfil de expressão de proteínas de *Salmonella enterica*
sorovar Enteritidis / Felipe Alves de Almeida. - Viçosa, MG,
2014.
x, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Maria Cristina Dantas Vanetti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.44-56.

1. *Salmonella enterica*. 2. *Quorum sensing*.
3. Autoindutor. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.344

FELIPE ALVES DE ALMEIDA

**INFLUÊNCIA DO *QUORUM SENSING* NA FORMAÇÃO
DE BIOFILME E NO PERFIL DE EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS DE *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

FELIPE ALVES DE ALMEIDA

**INFLUÊNCIA DO *QUORUM SENSING* NA FORMAÇÃO
DE BIOFILME E NO PERFIL DE EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS DE *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis**

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2014.

Prof. Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)

Prof. Uelinton Manoel Pinto
(Coorientador)

Prof^ª. Maria Cristina Baracat Pereira

Prof^ª. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

A Deus e a todos que torceram por mim

DEDICO.

“Não devemos permitir que alguém saia da nossa
presença sem se sentir melhor e mais feliz.”

Madre Teresa de Calcutá.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela realização desse sonho, sempre me dando força e paz para continuar esta jornada;

Aos meus pais, Rosa Mônica e Cássio, pelo amor verdadeiro e pela educação;

Aos meus irmãos, Raphael e Gustavo, pela amizade e pelas horas de descontração;

Aos meus avós, Celma, Dirceu, Gracy e Rubens (*in memoriam*), pelo amor incondicional, mesmo não entendendo o que é a pós-graduação;

A minha madrinha Elza (*in memoriam*), pelo amor, por deixar a maior herança da minha vida que é a educação;

Aos meus tios e primos, pelo carinho e pela amizade;

A toda minha família, pela torcida e pelas orações;

Ao Gabriel, pela amizade, pelo companheirismo e incentivo;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Microbiologia, pela qualidade da estrutura e do ensino;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado;

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pelos ensinamentos, pela amizade, compreensão e paciência, o que foram fundamentais para o êxito deste trabalho;

Ao meu coorientador professor Leandro Licursi de Oliveira, pela atenção, disponibilidade e pelos ensinamentos;

Ao meu coorientador professor Uelinton Manoel Pinto da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), pela disponibilidade, pela atenção e pelas sugestões;

À professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela atenção, pelas sugestões e por disponibilizar o Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas para a realização dos experimentos de proteômica;

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pelas sugestões e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios sempre que necessário;

A todos os professores que, durante o período da pós-graduação, contribuíram para minha formação;

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia pela amizade e disposição em ajudar, em especial, aos funcionários Adriana, José Cesário, Nilcéa, Sandra, Letícia, Rita, José Carlos e Amanda;

À Lanna e Patrícia Fontes do Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, pela atenção, pelos ensinamentos e pela paciência em me ensinar;

À Maria Emilene Campos-Galvão, pelo esclarecimento das minhas dúvidas;

À minha “irmã” Aline Dias Paiva da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pela amizade e pelos momentos de alegria compartilhados;

À minha “Chaperona”, também chamada de Déborah Romaskevis, pelo companheirismo e pela amizade;

Às minhas amigas de estudos na biblioteca (BBT), Elsa e Roméria, pelos ensinamentos e pela amizade;

Ao meu amigo André, pela amizade e pelos momentos de descontração;

À minha turma de mestrado, Conrado, Déborah, Edmo, Fernanda, Mariana, Pricila e Taídes, pelos momentos de estudo;

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/UFV, Amanda, Cláudia, Cleriane, Gardênia, Lays, Mayra Freitas, Mayra Galvão, Natan, Roméria e Simone, pelo carinho e pela ajuda nos experimentos;

Às minhas amigas do Laboratório de “Anaeróbicos”, Alexandra, Aline, Analice, Bianca, Cláudia, Déborah, Elsa, Isabela e Sofia, por me suportarem no laboratório, pela ajuda nos experimentos e pela amizade;

Aos meus amigos de Viçosa e de Juiz de Fora, pela amizade, pelo carinho, pelos momentos de alegria e descontração;

A todas as pessoas que, de alguma forma contribuíram e torceram por este sonho.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

FELIPE ALVES DE ALMEIDA, filho de Cássio Murilo de Almeida e Rosa Mônica Mattoso Alves, nasceu em Juiz de Fora - MG, em 10 de dezembro de 1988.

Em julho de 2011, graduou-se em Biomedicina pela Universidade Presidente Antônio Carlos em Juiz de Fora – MG.

Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. <i>Samonella</i> spp.	2
2.2. <i>Quorum sensing</i> (QS)	3
2.3. Sistema QS em <i>Samonella</i> spp.	5
2.4. Biofilme em <i>Samonella</i> spp.	8
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Condições de cultivo de <i>Salmonella</i>	13
4.2. N-dodecanoil homoserina lactona e furanonas	13
4.3. Avaliação do crescimento de <i>Salmonella</i> PT4 em anaerobiose	14
4.4. Determinação da motilidade de <i>Salmonella</i>	14
4.5. Quantificação do potencial de adesão e formação de biofilme por <i>Salmonella</i> em microplaca de poliestireno	15
4.6. Quantificação das células de <i>Salmonella</i> planctônicas e aderidas em poliestireno	15
4.7. Observação das células sésseis de <i>Salmonella</i> por microscopia	16
4.8. Extração de proteínas celulares de <i>Salmonella</i>	17
4.9. Separação de proteínas de <i>Salmonella</i> por eletroforese bidimensional	18
4.10. Análise e predição das proteínas de <i>Salmonella</i>	19
4.11. Análise estatística dos dados	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS

QS: Quorum sensing

AIs: Autoindutores

AI-1: Autoindutor-1

AI-2: Autoindutor-2

AI-3: Autoindutor-3

AHLs: Acil Homoserina Lactonas

C₁₂-AHL: N-Dodecanoil Homoserina lactona

PAIs ou SPIs: Ilhas de Patogenicidade

PT4: Fagotipo 4

CDC: Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos

LPS: Lipopolissacarídeo

EPS: Exopolissacarídeo

LB: Luria Bertani

TSB: Caldo Triptona de Soja

PCA: Ágar Padrão para Contagem

PBS (pH 7,4): Tampão Fosfato-Salino pH 7,4

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

D.O_{máx}: Densidade Óptica Máxima a 600 nm

PMSF: Fenilmetilsulfonil

TFE: Trifluoroetanol

CHCl₃: Clorofórmio

CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano-sulfonato

DTT: Ditioneitol

2-DE: Eletroforese Bidimensional

pI: Ponto Isoelétrico

MM: Massa Molecular

IEF: Focalização Isoelétrica

SDS-PAGE: Gel de Poliacrilamida 12 % na presença de Dodecil Sulfato de Sódio

UniProtKB: *Protein Knowledgebase*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

RESUMO

ALMEIDA, Felipe Alves de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Influência do *quorum sensing* na formação de biofilme e no perfil de expressão de proteínas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira e Uelinton Manoel Pinto.

Quorum sensing (QS) é um mecanismo de comunicação entre células microbianas mediado por moléculas sinalizadoras, denominadas autoindutores (AIs). Embora não produza o AI-1, que são moléculas de acil homoserina lactonas (AHLs), *Salmonella* responde às AHLs produzidas por outros micro-organismos por sintetizar a proteína de resposta ao AI-1, denominada de SdiA. Contudo, o gene *sdiA* ainda não tem sua função estabelecida em *Salmonella*. Neste trabalho foi avaliada a influência de n-dodecanoil homoserina lactona (C₁₂-AHL) e de furanonas, análogos de AHLs, sobre o crescimento, motilidade, adesão, formação de biofilme em poliestireno e síntese de proteínas por *Salmonella* Enteritidis PT4 em anaerobiose. Na presença ou na ausência de 50 nM de C₁₂-AHL e, ou de furanonas, o crescimento, a motilidade em massa ou por espalhamento (*swarming*) e a motilidade por contração ou por espasmos (*twitching*) deste patógeno não foram alterados. Conforme verificado pela determinação do potencial de adesão e formação de biofilme em microplacas, enumeração de células aderidas e microscopia confocal de epifluorescência, foi constatada que a presença de C₁₂-AHL induziu a formação de biofilme em superfície de poliestireno após 36 h de cultivo. Além disso, constatou-se o efeito antagonista das furanonas sobre a formação de biofilme nas mesmas condições. As proteínas sintetizadas por *Salmonella* Enteritidis PT4 na presença e na ausência de 50 nM de C₁₂-AHL após 7 h de cultivo em anaerobiose foram extraídas, separadas por eletroforese bidimensional e preditas por comparação do ponto isoelétrico e massa molecular disponíveis em bancos de dados. Foi verificado que, na presença de C₁₂-AHL houve síntese de maior número de proteínas, sendo que muitas delas estão relacionadas com o sistema QS e com a formação de biofilme. Os resultados obtidos evidenciam que a presença de C₁₂-AHL exógena influencia o metabolismo de *Salmonella* Enteritidis PT4, cultivada em condições de anaerobiose e indicam uma nova linha de investigação que pode contribuir para o esclarecimento dos mecanismos relacionados com a patogenicidade de *Salmonella*.

ABSTRACT

ALMEIDA, Felipe Alves de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2014. **Influence of quorum sensing on the biofilm formation and protein expression profile of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis**. Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-Adviser: Leandro Licursi de Oliveira and Uelinton Manoel Pinto.

Quorum sensing (QS) is a communication mechanism employed by microbial cells by means of signaling molecules, called autoinducers (AIs). Even though *Salmonella* does not produce AI-1, also known as acyl homoserine lactones (AHLs), it responds to AHLs produced by other microorganisms through an AI-1 response protein called SdiA. However, the *sdiA* gene has not established function in *Salmonella*. In this work the influence of n-dodecanoyl homoserine lactone (C₁₂-AHL) and furanones, AHLs analogs, was assessed on the growth, motility, adhesion, biofilm formation on polystyrene and protein synthesis by *Salmonella* Enteritidis PT4 under anaerobic environment. In the presence or absence of 50 nM C₁₂-AHL and/or furanones, growth, swarming and twitching motilities of this pathogen were not altered. We found that the presence of C₁₂-AHL induced biofilm formation after 36 h of cultivation as determined by the adhesion potential and biofilm formation on microplates, the enumeration of adhered cells and by confocal epifluorescence microscopy. The results were evaluated by determining the adhesion potential and biofilm formation on microplates, the enumeration of adhered cells and by confocal epifluorescence microscopy. The antagonistic effect of furanones was also determined by using the same conditions. The proteins synthesized by *Salmonella* Enteritidis PT4 in the presence or absence of 50 nM C₁₂-AHL, after 7 h of incubation in anaerobic conditions, were extracted, separated by bidimensional electrophoresis and predicted on the basis of their isoelectric point and molecular masses available on databases. In the presence of C₁₂-AHL, there was an increased synthesis of proteins, with the majority related to the QS system and biofilm formation. The results demonstrate that the presence of exogenous C₁₂-AHL affects the metabolism of *Salmonella* Enteritidis PT4, cultivated under anaerobic conditions and point towards a new line of investigation which could contribute to the understanding of the pathogenicity mechanisms in *Salmonella*.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella é um dos patógenos mais comumente veiculados por alimentos, principalmente por carne de aves e ovos. No Brasil, o fagotipo mais prevalente nas infecções causadas por *Salmonella* é o sorovar Enteritidis fagotipo 4, podendo levar os infectados a serem hospitalizados e até à morte. A elevada virulência deste patógeno está relacionada com a presença de até 23 Ilhas de Patogenicidade (PAIs ou SPIs), que são sequências de genes presentes no genoma de bactérias patogênicas e que codificam para a expressão de fatores de virulência. Alguns destes fatores de virulência foram descritos como sendo regulados pelo mecanismo de comunicação entre células microbianas denominado *quorum sensing* (QS), que também está presente em *Salmonella* spp.

A comunicação por QS em *Salmonella* spp. pode ser mediada por três tipos de autoindutores (AI), denominados AI-1, AI-2 e AI-3. Contudo, o mecanismo de comunicação célula-célula por AI-1 em *Salmonella* é incompleto, pois este patógeno não sintetiza o AI-1, também denominado de acil homoserina lactona (AHL). Porém, *Salmonella* apresenta uma proteína conhecida como SdiA, um homólogo da proteína LuxR, que permite detectar as AHLs produzidas por outros micro-organismos. As informações sobre os genes regulados pelas AHLs em *Salmonella* são escassas e sugere-se que há aumento na expressão de genes de virulência pertencentes à SPI-1 e genes envolvidos na formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis PT4.

O efeito positivo do QS sobre a expressão de genes das SPI e formação de biofilme aumenta a virulência e a capacidade deste patógeno de se adaptar a condições de estresse. Desse modo, a compreensão da função do sistema QS sobre a regulação de fenótipos em *Salmonella* spp. se torna de interesse. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do AI-1 sobre a adesão e a formação de biofilme, assim como sobre a expressão de proteínas em *Salmonella enterica*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Salmonella* spp.

Salmonella é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae, representado por bactérias gram-negativas, em forma de bacilos, anaeróbias facultativas e não esporulantes; na maioria das vezes são móveis (com flagelos peritríquios) e não fermentadoras de lactose. Este gênero é extremamente heterogêneo, composto por duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, esta última com mais de 2.600 sorotipos (COLLINS e KENNEDY, 1983; BRONZE e GREENFIELD, 2005; SU e CHIU, 2007; MURRAY *et al.*, 2007). A classificação em sorogrupos é realizada com base no antígeno oligossacarídeo O, enquanto a classificação em sorotipos é baseada nos antígenos proteína flagelar H e polissacarídeo capsular de virulência Vi (BRONZE e GREENFIELD, 2005). A classificação em fagotipos é baseada na suscetibilidade de *Salmonella* a diferentes bacteriófagos (DOYLE, 1990).

O Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (EUA) compilou os dados de 11 anos e estimou a ocorrência de 47,8 milhões de doenças causadas pela ingestão de alimentos. Aproximadamente 20% (9,4 milhões) das doenças de origem alimentar tem o agente etiológico identificado e *Salmonella* spp. não tifoide foi relacionada como causa de 1.027.561 doenças, 19.336 hospitalizações e 378 mortes. Desse modo, *Salmonella* é a principal bactéria veiculada por alimentos nos EUA (SCALLAN *et al.*, 2011). No Brasil, segundo dados da Secretaria de Vigilância à Saúde, do total de surtos notificados entre os anos de 2000 a 2011, 19,16 % estavam associados à presença de *Salmonella* (BRASIL, 2011).

No Brasil, *S. enterica* sorovar Enteritidis fagotipo 4 (PT4) é o mais prevalente entre os isolados de infecções causadas pela ingestão de alimentos de origem animal, principalmente aves e ovos (ANGULO e SWERDLOW, 1998; LYNCH *et al.*, 2006). A virulência deste fagotipo de *Salmonella* em modelos animais infectados por via oral está ligada à maior tolerância a uma gama de condições de estresse. Esta capacidade adaptativa às condições estressantes está relacionada com a os fatores de virulência de *Salmonella* spp. que, na maioria das vezes, são codificados em regiões do DNA bacteriano denominadas Ilhas de Patogenicidade (PAIs ou SPIs) (HUMPHREY *et al.*, 1996; 1998; ONG *et al.*, 2010). No gênero *Salmonella*, já foram descritas 23 PAIs (HAYWARD *et al.*, 2013), as quais possuem estruturas e funções distintas (HENSEL,

2004). Genes relacionados à virulência como *hilA*, *invA* e *invF*, presentes na PAI-1, e genes envolvidos na formação de biofilme por *Salmonella* spp. foram mais expressos na presença de moléculas exógenas do sistema *quorum sensing* (WALTERS e SPERANDIO, 2006; CAMPOS-GALVÃO, 2012).

2.2. *Quorum sensing* (QS)

Quorum sensing (QS) é um mecanismo de comunicação entre células microbianas que leva à expressão diferencial de genes em resposta a mudanças na densidade populacional (FUQUA *et al.*, 1996, 2001; KELLER e SURETTE, 2006). Tal sistema já foi descrito em muitos micro-organismos, inclusive em *Salmonella* spp. (SMITH *et al.*, 2004; AMMOR *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram que QS regula uma série de fenótipos bacterianos, incluindo a produção de antibióticos, formação de biofilmes, bioluminescência, diferenciação celular, competência, produção de pigmentos, conjugação, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, esporulação, motilidade em superfícies, produção de toxinas e expressão de genes de virulência (SMITH *et al.*, 2004; WALTERS e SPERANDIO, 2006; KENDALL e SPERANDIO, 2007; HUGHES e SPERANDIO, 2008).

QS é baseado na produção, liberação e detecção de moléculas químicas sinalizadoras, de baixo peso molecular, denominadas autoindutoras ou feromônios, as quais podem ser divididas em quatro categorias:

1) derivados de ácidos graxos, denominados autoindutores-1 (AI-1), geralmente acil homoserinas lactonas (AHLs), usados por um grande número de bactérias gram-negativas para a comunicação intraespécie (MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD *et al.*, 2001) além de cumaril homoserina lactona (SCHAEFER *et al.*, 2008), γ – butirato lactona (CHATER e HORINOUCI, 2003), ácidos graxos insaturados (RYAN *et al.*, 2009), quinolona (DUBERN e DIGGLE, 2008) e alcano substituído (NG e BASSLER, 2009);

2) furanosil borato diéster, autoindutor-2 (AI-2), produzido por bactérias gram-negativas e gram-positivas e utilizado para comunicação intra e interespecie (SCHAUDER e BASSLER, 2001; CHEN *et al.*, 2002);

3) autoindutor-3 (AI-3), de estrutura parecida com a das catecolaminas, sintetizado e utilizado por algumas bactérias gram-negativas (SPERANDIO *et al.*, 2003;

MOREIRA *et al.*, 2010), além de epinefrina e norepinefrina, produzidas por células de mamíferos e utilizadas por bactérias gram-negativas (MOREIRA *et al.*, 2010);

4) peptídeos de baixo peso molecular ou oligopeptídeos utilizados por bactérias gram-positivas (MILLER e BASSLER, 2001; WHITEHEAD *et al.*, 2001).

A Figura 1 mostra as estratégias de comunicação celular em bactérias gram-negativas pelas principais moléculas sinalizadoras como AI-1 (AHLs), AI-2 e AI-3 (KELLER e SURETTE, 2006).

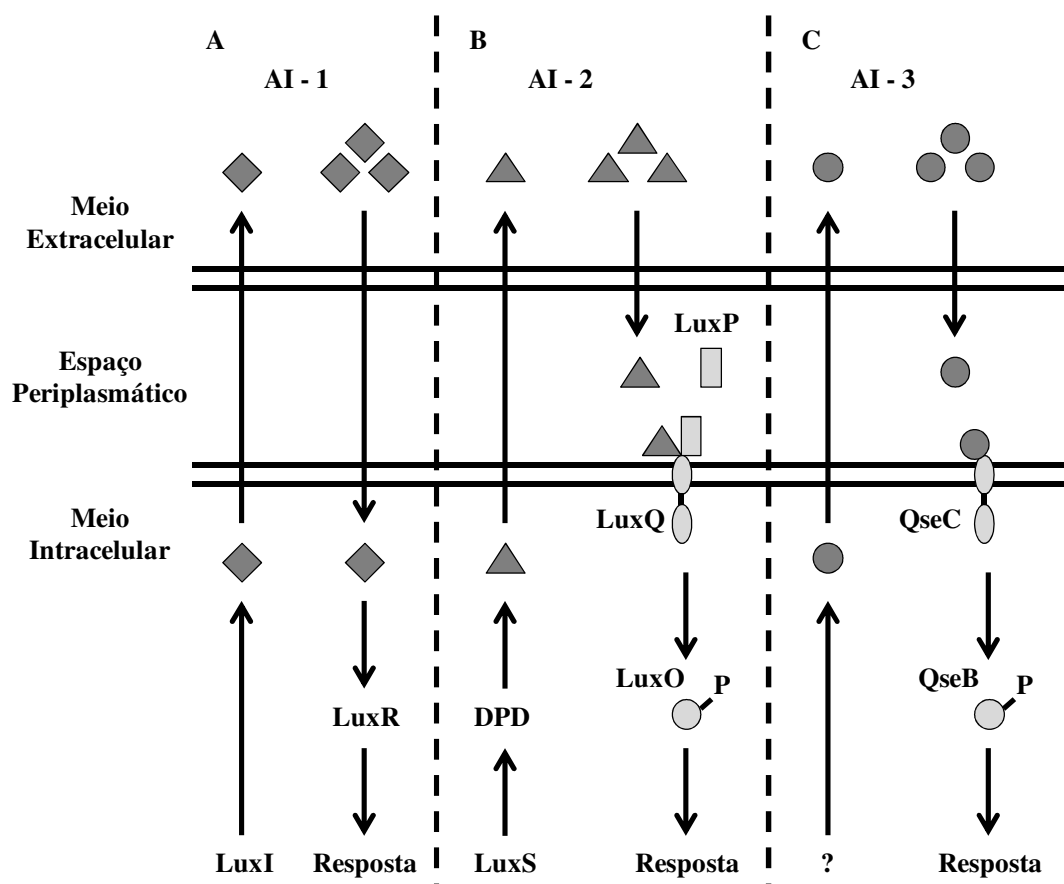


Figura 1. Estratégia de comunicação celular em bactérias gram-negativas **A.** Estratégia mediada pelo AI-1, acil homoserina lactona (AHL). AI-1 é sintetizado por LuxI e liberado no meio extracelular. Quando AI-1 difunde para o intracelular interage com LuxR e resulta na resposta celular. **B.** Estratégia 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 com consequente ativação e/ou repressão gênica. **C.** Estratégia mediada pelo AI-3, autoindutor de estrutura parecida com a das catecolaminas. O AI-3 é liberado no meio, interage com QseC e esta proteína fosforila a proteína reguladora de resposta QseB, resultando em resposta celular. Já a estratégia mediada por epinefrina e norepinefrina ocorre de forma semelhante a do AI-3, porém a histidina quinase é a QseE. Fonte: adaptado de Parker e Sperandio (2009).

2.3. SISTEMA QS EM *Salmonella* spp.

A comunicação por QS em *Salmonella* pode ser mediada pelos três tipos de autoindutores, AI-1, AI-2 e AI-3 (WALTERS e SPERANDIO, 2006).

O primeiro sistema QS em *Salmonella* é incompleto, pois este patógeno não possui o gene homólogo a *luxI*, que codifica para sintase do AI-1 e, conseqüentemente, não produz AHLs. No entanto, um homólogo de LuxR, conhecido como SdiA, está presente e permite a detecção de sinais produzidos por outras espécies de microorganismos (MICHAEL *et al.*, 2001; SMITH e AHMER, 2003) e que regulam a expressão gênica em *Salmonella* (STEENACKERS *et al.*, 2012). O gene *sdiA* situa-se adjacente aos genes *yecC*, *sirA* e *uvrC* (AHMER *et al.*, 1998). O regulador SdiA controla os genes encontrados no plasmídeo de virulência pSLT de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium que estão possivelmente envolvidos na sobrevivência do microorganismo durante a infecção em humanos, além dos genes *rck*, *pefI* e do operon *srgABCDE* (MICHAEL *et al.*, 2001; STEENACKERS *et al.*, 2012). Por meio de análises *in silico* das sequências de DNA, as funções de alguns genes foram sugeridas, e *srgA* parece codificar um homólogo da proteína periplasmática dissulfeto isomerase DsbA; *srgB* codifica uma lipoproteína putativa; *srgC* codifica um suposto tipo de regulador transcricional semelhante a *araC* (MICHAEL *et al.*, 2001). Acredita-se que *srgE* tenha sido adquirido por transferência horizontal com função desconhecida, porém, a análise *in silico* da sequência de nucleotídeos sugere que a proteína SrgE pode estar envolvida em sistemas de secreção tipo III (SABAG-DAIGLE *et al.*, 2012). A proteína SdiA é regulada por SirA, uma proteína reguladora de invasão celular e de genes de virulência presentes na PAI-1, principalmente relacionados à motilidade. Além disso, SirA também regula o operon *hil*, que codifica o sistema de secreção tipo I e III, e CsrB, uma proteína de ligação ao RNA (SABAG-DAIGLE *et al.*, 2012). Os genes de virulência *hilA*, *invA* e *invF*, pertencentes à PAI-1, e genes envolvidos na formação de biofilmes, como *glgC*, *fliF*, *lpfA* e *fimF* de *Salmonella* Enteritidis PT4 tiveram aumento na expressão após 7 h de incubação em meio contendo C₁₂-AHL (CAMPOS-GALVÃO, 2012).

O segundo sistema QS reconhecido em *Salmonella* é mediado pelo AI-2, (2R, 4SL)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano (R-THMF), sintetizado por LuxS e derivado de DPD (TAGA *et al.*, 2001). Um meio de cultura rico em nutrientes favorece a produção de AI-2, o qual é internalizado por Lsr, um transportador ABC. O operon *lsr*

contêm sete genes, *lsrACDBFGE* (Figura 2), sendo sua transcrição induzida por AI-2 (TAGA *et al.*, 2001, 2003). O componente proteico periplasmático denominado LsrB se liga ao AI-2; LsrK é uma quinase, que fosforila o AI-2, enquanto LsrF e LsrG parecem modificar o seu grupamento fosfato (TAGA *et al.*, 2001, 2003; BYRD e BENTLEY; 2009).

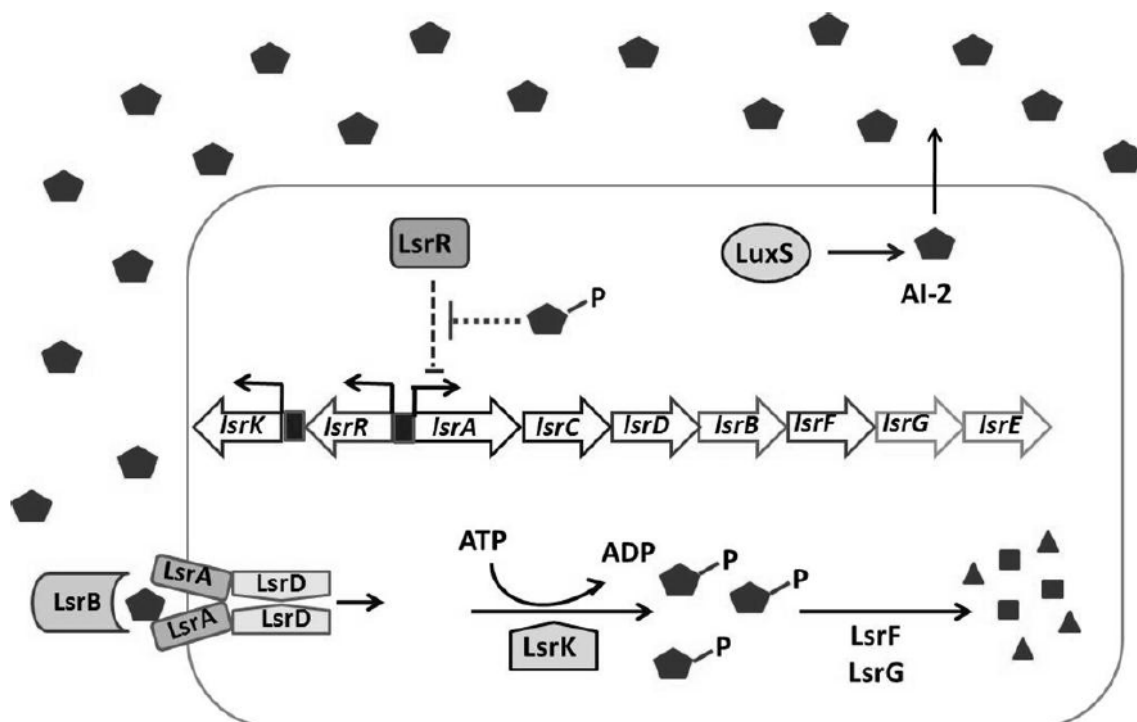


Figura 2. Modelo de regulação, transporte e modificação do AI-2 pelas proteínas Lsr. O AI-2 (pentágono) é sintetizado pela proteína LuxS e acumula no meio extracelular. A expressão basal de transportadores Lsr permite que alguns AI-2 entrem no citoplasma, onde são fosforilados por LsrK. O AI-2 fosforilado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

Alguns genes presentes na PAI-1, como *hilA* e *prgH*, são regulados pela proteína LuxS em *Salmonella Typhimurium* (CHOI *et al.*, 2007). Widmer *et al.* (2007) avaliaram a expressão de genes de virulência em estirpes selvagem e mutante em *luxS* de *Salmonella Typhimurium* e observaram que 23 genes exibiram indução e repressão significativa mediante adição de AI-2: vários genes regulados positivamente codificaram proteínas citoplasmáticas ou de membrana externa, enquanto os regulados negativamente estavam associados à virulência bacteriana. O AI-2 é também capaz de regular genes como *pfkA*, *gpmI* e *talB*, relacionados à expressão de proteínas associadas ao transporte e metabolismo de carboidratos (SONI *et al.*, 2008). Jesudhasan *et al.* (2010) avaliaram a expressão gênica em estirpes selvagem e mutante em *luxS* de

Salmonella e observaram que os genes envolvidos na formação de biofilme eram diferentemente expressos. Segundo Walters e Sperandio (2006), genes envolvidos na motilidade como *flhDC*, *motA*, *motB* e *flinN*, também são regulados pelo sistema QS mediado por AI-2 em *Salmonella Typhimurium*.

As furanonas são consideradas antagonistas de AI-1 e AI-2 do sistema QS em bactérias gram-negativas por serem análogas, porém o mecanismo de atuação não é totalmente conhecido (ZHU e WINANS, 2001; HENTZER *et al.*, 2002, 2003). Contudo, Manefield *et al.* (2002) supõem que as furanonas produzem mudanças conformacionais, que resultam em degradação proteolítica rápida do complexo LuxR/AHL, enquanto as AHLs atuam como estabilizadores das proteínas LuxR instáveis ou de seus homólogos. Desse modo, as furanonas são incapazes de promoverem a regulação gênica (RASMUSSEN *et al.*, 2000; MANEFIELD *et al.*, 2002). Análises de microarranjo em *Salmonella* revelaram que as furanonas interferem na síntese de flagelos (JANSSENS *et al.*, 2008), podendo conseqüentemente afetar a formação de biofilme, uma vez que os flagelos funcionais são necessários para a formação do biofilme em *Salmonella* (STEENACKERS *et al.*, 2012). Campos-Galvão (2012) evidenciou que a adição de uma mistura de C₁₂-AHL e antagonistas das AHLs, como furanonas, resultaram em células de *Salmonella* aderidas em poliestireno, porém não houve a formação da estrutura compacta típica de biofilme, enquanto na presença de AHLs e ausência de furanonas, houve a formação de biofilme denso. Chorianopoulos *et al.* (2010) demonstraram que sobrenadantes livre de células de *Hafnia alvei* possuem compostos que influenciam negativamente na fase inicial de formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis em aço inoxidável, embora a natureza destes compostos seja desconhecida. Entretanto, *H. alvei* é uma enterobactéria reconhecidamente produtora de AHL (PINTO *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2009).

O terceiro sistema QS presente em *Salmonella* é pouco conhecido, mas envolve a comunicação por AIs aromáticos (AI-3) produzidos pela microbiota gastrointestinal normal e por hormônios da classe catecolamina, como adrenalina/noradrenalina, produzidos pelo hospedeiro. O AI-3 e adrenalina/noradrenalina são reconhecidos pelo mesmo receptor, ortólogo de QseB. Porém, quando o sinal for por AI-3, o ortólogo de QseB interage com o sensor quinase periplasmático QseC e quando for adrenalina/noradrenalina, interage com QseE. Este sistema regula genes relacionados ao flagelo e motilidade como *flhDC*, *fliA*, *fliC*, *fliDST*, *fliE*, *fliFGHIJK*, *fliMNOPQR*, *flgMA*, *motAB*, além de genes relacionados a quimiotaxia como *cheAB* e *cheRBYZ*, ao

sistema de secreção tipo III (WALTERS e SPERANDIO, 2006; WALTERS *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2010) e a virulência (ASAD e OPAL, 2008; MOREIRA *et al.*, 2010). *Salmonella* Typhimurium codifica o ortólogo de *qseBC* de *E. coli* O157:H7, o qual influencia na virulência sistêmica, colonização e motilidade (ASAD e OPAL, 2008; MOREIRA *et al.*, 2010).

2.4. BIOFILME EM *Samonella* spp.

Os biofilmes são comunidades de células microbianas ligadas a uma superfície biótica ou abiótica, estruturadas e delimitadas por expolissacarídeos (EPS) auto-produzidos (COSTERTON *et al.*, 1999; DONLAN e COSTERTON, 2002; HALL-STOODLEY *et al.*, 2006; HOMOE *et al.*, 2009; COENYE e NELIS, 2010).

A mudança de um estado de vida livre para o modo de crescimento em biofilme coincide com uma alteração global no metabolismo da célula bacteriana (HAMILTON *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2010). Um número expressivo de genes e proteínas associados à formação e desenvolvimento de biofilmes por *Salmonella* tem sido identificado utilizando técnicas como microarranjo (HAMILTON *et al.*, 2009), proteômica (HAMILTON *et al.*, 2009; MANGALAPPALLI-ILLATHU *et al.*, 2008), metabolômica (WHITE *et al.*, 2010) e mutagênese (HERMANS *et al.*, 2011).

Parte da formação do biofilme depende das condições ambientais que irão induzir a expressão diferenciada de proteínas, bem como de ácidos graxos, EPS e outros polímeros (BRANDA *et al.*, 2006). A formação de biofilme por alguns microorganismos pode ser regulada em função da disponibilidade de nutrientes e pelo próprio sistema *QS* (STANLEY e LAZAZZERA, 2004; GOERES *et al.*, 2005; CAMPOS-GALVÃO, 2012; CASTELIJN *et al.*, 2012).

A influência do *QS* no controle da formação e desenvolvimento do biofilme já foi observada em *Salmonella* Typhi (PROUTY *et al.*, 2002), *S. enterica* sorovar Enteritidis PT4 578 (CAMPOS-GALVÃO, 2012) e em muitas outras espécies bacterianas como *Pseudomonas aeruginosa* (DAVIES *et al.*, 1998), *Aeromonas hydrophila* (LYNCH *et al.*, 2002), *Burkholderia cepacia* (HUBER *et al.*, 2001; RIEDEL *et al.*, 2003), *Nitrosomonas europea* (BATCHELOR *et al.*, 1997) e *Streptococcus mutans* (MERRITT *et al.*, 2003). Na maioria das espécies bacterianas, a formação de microcolônias não é dependente do sistema *QS*, mas a diferenciação das

microcolônias para formar o biofilme maduro é dependente da comunicação entre as células (PARSEK e GREENBERG, 2000; HUBER *et al.*, 2001; LYNCH *et al.*, 2002).

Segundo Steenackers *et al.* (2012), a síntese de componentes estruturais de biofilmes em *Salmonella* spp. é regulada por diversas vias, inclusive pelo sistema *QS*. A formação de biofilme por *Salmonella* em células epiteliais depende de fímbrias do tipo 1, fímbrias codificadas por plasmídeo (*Pef*), fímbrias curli (*Csg*), fímbrias polares longas (*Lpf*), fator de colonização bovina (*Bcf*), fímbrias *Sth*, ácido colânico e celulose (BODDICKER *et al.*, 2002; LEDEBOER e JONES, 2005; LEDEBOER *et al.*, 2006).

A função de *SdiA* do sistema *QS* por *AI-1* na formação de biofilme em *E. coli* é conhecida e estabelecida (LEE *et al.*, 2009). Entretanto, em *Salmonella* ainda é estudada e foi demonstrada por Campos-Galvão (2012). Além disso, já foi evidenciado que *SdiA* regula a síntese de proteínas da matriz extracelular aliadas à resistência à morte, além de regular a síntese da proteína *Rck*, utilizada na adesão às células epiteliais, o que reforça a ideia da ligação de *SdiA* com a formação de biofilmes por *Salmonella* (HEFFERNAN *et al.*, 1992; CRAGO e KORONAKIS, 1999). Dois outros genes do operon *rck* e os genes *pefI* e *srgA*, parecem afetar a expressão e função do operon *pef* presente no plasmídeo, o qual contém genes que codificam para fímbrias: *PefI* é um regulador do operon *pef*, enquanto *srgA* catalisa a formação de uma ligação dissulfeto da subunidade fimbrial *PefA* (AHMER *et al.*, 1998; NICHOLSON e LOW, 2000; BOUWMAN *et al.*, 2003; SMITH e AHMER, 2003). Desse modo, *SdiA* pode afetar, indiretamente, a expressão e montagem de fímbrias sobre a superfície celular e influenciar a formação de biofilmes (STEENACKERS *et al.*, 2012).

Campos-Galvão (2012) analisou a formação de biofilmes por *S. enterica* sorovar Enteritidis PT4 578 em cupons de poliestireno, na ausência e na presença de diferentes AHLs e de inibidores de *QS*, como furanonas. Após 36 h de incubação em meio de cultura sem AHLs e em anaerobiose, não foram observadas estruturas típicas de biofilme. O biofilme, com a presença de exopolissacarídeos, foi observado quando o meio de cultivo foi acrescido de uma mistura de diferentes AHLs, contendo de C_6 a C_{12} -AHLs. Quando C_{12} -AHL foi adicionada isoladamente, foi observada a formação de um agregado de células maior e também uma estrutura característica de biofilme. A adição de uma mistura de C_{12} -AHL e antagonistas das AHLs (furanonas) resultou em células aderidas, porém não houve a formação da estrutura compacta típica de biofilme. Além disso, após 7 h de incubação em meio contendo C_{12} -AHL foi observado, em células planctônicas, o aumento na expressão de genes envolvidos na formação de biofilmes,

como *glgC*, responsável pela regulação da biossíntese de glicogênio, *fliF* relacionado à função motora, *lpfA* e *fimF* relacionados com a síntese de fímbria tipo longa e do tipo I, respectivamente. Os genes de virulência *hilA*, *invA* e *invF*, pertencentes à PAI-1 de *Salmonella*, também tiveram aumento na expressão (CAMPOS-GALVÃO, 2012).

O sistema *QS* regulado por AI-2 afeta mais de 400 genes em *E. coli* O157:H7, incluindo genes de quimiotaxia, síntese de flagelo e motilidade, mostrando a possível relação do *QS* com a etapa inicial de formação do biofilme (SPERANDIO *et al.*, 2002). Em *Salmonella*, esse sistema *QS* utiliza a proteína LuxS para a síntese de AI-2 (SURETTE *et al.*, 1999; De KEERSMAECKER *et al.*, 2006), sendo este detectado e transportado para dentro da célula pelo sistema Lsr (JESUDHASAN *et al.*, 2010). Biofilmes espalhados, contendo pouco exopolissacarídeo, foram observados na superfície de cálculos biliares após quatro dias de incubação de *Salmonella* Typhimurium mutante em *luxS*, enquanto o selvagem apresentou biofilme mais denso (PROUTY *et al.*, 2002). Jesudhasan *et al.* (2010) observaram redução na formação de biofilmes em poliestireno por *Salmonella* Typhimurium mutante em *luxS*. Comparações entre análises de microarranjo de *Salmonella* tipo selvagem e mutante em *luxS* mostraram que vários genes de motilidade e biofilme foram reprimidos nas linhagens mutantes, o que sugere que o AI-2 pode estar envolvido na regulação de genes específicos para a formação de biofilme em *Salmonella* Typhimurium (STEENACKERS *et al.*, 2012).

Geralmente, a matriz extracelular dos biofilmes é composta por uma mistura de proteínas secretadas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e células mortas (PARSEK e GREENBERG, 2005). A fração proteica é constituída por fímbrias curli adesivas (alternativamente chamada Tafi ou fímbrias agregativas finas (Agf) em *Salmonella*) (RÖMLING *et al.*, 1998a, 1998b) e a proteína BapA secretada (LATASA *et al.*, 2005). A fração de EPS é essencialmente constituída por celulose (ZOGAJ *et al.*, 2001), antígeno O capsular (O-Ag-cápsula) (GIBSON *et al.*, 2006) e outros EPS, como um polissacarídeo capsular (REZENDE *et al.*, 2005) e lipopolissacarídeo (LPS) (WHITE *et al.*, 2003; REZENDE *et al.*, 2005; ANRIANY *et al.*, 2006; GIBSON *et al.*, 2006). A matriz extracelular permite que os micro-organismos em biofilmes fiquem protegidos de estresses ambientais, antibióticos (HOIBY *et al.*, 2010), desinfetantes e do sistema imune do hospedeiro (JENSEN *et al.*, 2010) e, como consequência, os biofilmes são dificilmente erradicados (BURMOLLE *et al.*, 2010). Contudo, os componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella* podem variar com as condições

ambientais, não sendo possível generalizar a regulação da formação do biofilme e a composição da matriz extracelular (WANG *et al.*, 2004).

Embora estudos como o de Campos-Galvão (2012), tenham indicado a influência dos sistemas *QS* na formação de biofilmes em *Salmonella*, mais estudos são necessários para a compreensão do impacto dos AIs-1 sobre a formação do biofilme neste patógeno, incluindo a influência sobre a regulação de genes relacionados à formação de biofilme e virulência, produção de EPS, mecanismos de patogenicidade, motilidade, virulência, competição interespecies e regulação do crescimento. Além disso, se torna necessário avaliar o perfil de proteínas diferentemente expressas na presença de AHLs, bem como suas funções na célula para uma melhor compreensão do sistema (Di CAGNO *et al.*, 2011; STEENACKERS *et al.*, 2012; SHROUT e NERENBERG, 2012).

Considerando que a formação de biofilme é um importante mecanismo de patogenicidade em *Salmonella* e uma grande preocupação para a indústria de alimentos, devido sua capacidade de contaminação dos alimentos durante o processamento e as dificuldades de erradicação dos mesmos (BURMOLLE *et al.*, 2010; HOIBY *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2010; SREY *et al.*, 2013), torna-se de interesse a avaliação da conexão entre o sistema *QS* e a formação de biofilmes. O esclarecimento das etapas destes processos em *Salmonella* se revela importante, não só para o desenvolvimento de novas tecnologias que garantam alimentos microbiologicamente seguros, mas também para a melhor compreensão da interação patógeno-hospedeiro.

3. OBJETIVOS

Analisar o crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, bem como a motilidade na condição de anaerobiose, na presença e ausência de AHLs, e na presença de furanonas;

Analisar a adesão e formação de biofilmes por *S. enterica* sorovar Enteritidis em poliestireno na condição de anaerobiose, na presença e ausência de AHLs, e na presença de furanonas;

Analisar as proteínas celulares de *S. enterica* sorovar Enteritidis cultivada em anaerobiose, na presença e ausência de AHLs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, de Microbiologia de Anaeróbios e de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, no Laboratório de Imunovirologia do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e no Núcleo de Análise de Biomoléculas.

4.1. Condições de cultivo de *Salmonella*

Foi utilizada a estirpe de *S. enterica* sorovar Enteritidis fagotipo PT4 578, isolada de carne 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 cloreto de sódio 0,4%), pH 6,8 a 7,0, e acrescido de 20 % de glicerol estéril e conservado a – 20 °C.

Antes de cada experimento, as células foram pré-ativadas e reativadas em caldo triptona de soja (TSB, Merck, Alemanha), incubadas a 37 °C, por 24 h, em anaerobiose. Após a reativação, uma alíquota foi transferida para 10 mL de TSB, incubada a 37 °C, por 4 h, em anaerobiose e, em seguida, a cultura foi colocada em tubo de centrifuga de 50 mL. A cultura foi centrifugada (5.000 x g, 10 min, 4 °C, Sorvall, Estados Unidos), lavada com 2 mL de solução salina (0,85 %), o centrifugado foi suspenso em solução salina (0,85 %) e padronizado com 0,10 de absorvância a 600 nm (aproximadamente 10⁷ UFC. mL⁻¹) utilizando espectrofotômetro modelo 1510 (Thermo Fisher Scientific, Finlândia) (CAMPOS-GALVÃO, 2012).

4.2. N-dodecanoil homoserina lactona e furanonas

N-dodecanoil homoserina lactona (C₁₂-AHL, Fluka, Suíça) e uma mistura de 3-metil-2(5H) furanona, 2-metiltetrahydro-3-furanona, 2(5H)-furanona e 2,2-dimetil-3(2H) furanona (Aldrich, Alemanha) foram ressuspensas em acetonitrila (Merck, Alemanha) a uma concentração de 10 mM de cada furanona. Estas soluções foram adicionadas ao meio de cultura para cultivo de *Salmonella*, separadas e em mistura, para que atingissem uma concentração final de 50 nM e que correspondia a uma concentração inferior a

1,0 % de acetonitrila (MICHAEL *et al.*, 2001). O mesmo volume de acetonitrila foi adicionado aos meios de cultivo no tratamento controle.

4.3. Avaliação do crescimento de *Salmonella* PT4 em anaerobiose

O crescimento de *Salmonella* foi avaliado em meio TSB, em câmara de anaerobiose de modelo estático (Coy Laboratory, Estados Unidos) contendo atmosfera com mistura de gases H₂ (3,0 a 5,0 %) e CO₂ (95,0 a 97,0 %). A cada frasco contendo 20 mL de TSB em anaerobiose, foram adicionados 2,22 mL da cultura padronizada conforme descrito no item 4.1 e 110 µL de cada solução a ser testada, preparadas conforme descrito no item 4.2. Os frascos foram incubados a 37 °C por até 8 h em anaerobiose e a absorvância da suspensão de células determinada em espectrofotômetro a 600 nm.

4.4. Determinação da motilidade de *Salmonella*

A motilidade foi determinada em meio TSB, em câmara de anaerobiose de modelo estático contendo atmosfera com mistura de gases H₂ e CO₂. A cada frasco contendo 20 mL de TSB acrescentado de 1,0 ou 0,7 % (m/v) de ágar e em anaerobiose, foram adicionados 110 µL de cada solução de AHL e, ou furanona a serem testadas, preparadas conforme descrito no item 4.2 e vertido em placa de Petri. Para determinar a motilidade por espalhamento (*swarming*), uma alíquota de 5 µL da cultura padronizada, conforme descrito no item 4.1, foi disposta no centro de uma placa contendo 0,7 % (m/v) de ágar. A placa foi exposta por 1 h à temperatura ambiente e, em seguida, foi incubada a 37 °C, em câmara de anaerobiose de modelo estático contendo atmosfera com mistura de gases H₂ e CO₂. O diâmetro das colônias foi determinado nos tempos 2, 7, 12, 18, 24, 36, 42 e 48 h (HARSHEY e MATSUYAMA, 1994; TOGUCHI *et al.*, 2000; ULRICH, 2004). Para determinar a motilidade por contração ou por espasmos (*twitching*), o procedimento descrito anteriormente foi seguido, exceto para o volume de cultura aplicado que foi 10 µL e a concentração de ágar em TSB foi 1 % (m/v) (TOGUCHI *et al.*, 2000; REIMMANN *et al.*, 2002; ULRICH, 2004).

4.5. Quantificação do potencial de adesão e formação de biofilme por *Salmonella* em microplaca de poliestireno

A quantificação do potencial de adesão e formação de biofilmes foi avaliada em microplaca de poliestireno com 96 poços, com cultivo em câmara de anaerobiose de modelo estático contendo atmosfera com mistura de gases H₂ e CO₂. A cada poço da microplaca foram adicionados 180 µL de TSB, 20 µL da cultura padronizada e 1 µL de cada solução a ser testada, preparadas conforme descrito nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente. As microplacas foram incubadas a 37 °C por até 36 h, com substituição do meio de cultura inoculado e das soluções a serem testadas a cada 10 h. A absorvância da suspensão de células foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm após 2, 7, 26 e 36 h de incubação. Após cada tempo, o meio de cultura foi removido dos poços invertendo a microplaca sobre papel absorvente. As células aderidas foram coradas por 30 min com 200 µL de cristal violeta a 0,1 % (p/v) em água. Em seguida, o corante foi descartado e os poços foram lavados delicadamente, por três vezes consecutivas, com 300 µL de água destilada. As placas foram secas em estufa a 37 °C, por 15 min. O cristal violeta retido pelas células aderidas foi removido pela adição de 200 µL de etanol 95 % (v/v) e a absorvância foi avaliada em espectrofotômetro a 590 nm (CONWAY *et al.*, 2002). A quantificação do potencial de adesão e formação de biofilme foi calculada pela razão entre a densidade óptica do extrato de cristal violeta a 590 nm e a densidade óptica da cultura de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 a 600 nm, para que o resultado não tenha a interferência da diferença de crescimento celular nas diferentes condições experimentais.

4.6. Quantificação das células de *Salmonella* planctônicas e aderidas em poliestireno

Os cupons de poliestireno e hastes metálicas foram lavados com bucha macia e não abrasiva com detergente líquido, seguido de enxague com água destilada esterilizada. Em seguida, foram imersos em hidróxido de sódio 1 % (m/v) em banho de ultrassom por 1 h para a remoção de gordura e enxaguados com água destilada esterilizada. Foram então imersos em etanol 92 % (v/v) em banho de ultrassom por 30 min e enxaguados com água destilada esterilizada. Após esse enxágue os cupons foram colocados em uma placa de Petri esterilizada e esta colocada em fluxo laminar

por 15 min com a luz ultravioleta ligada. A avaliação da esterilidade dos cupons foi feita, submergindo um cupom em TSB com posterior incubação a 37 °C por 48 h, sendo após esse tempo, verificado se houve ou não crescimento. Os cupons de poliestireno foram presos pelas hastes metálicas na borda de frascos contendo 10 mL de TSB em anaerobiose, sendo adicionados 1,11 mL da cultura padronizada e 56 µL de cada solução a ser testada, preparadas conforme descrito nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C por até 36 h, em câmara de anaerobiose de modelo estático contendo atmosfera com mistura de gases H₂ e CO₂, com substituição do meio de cultura inoculado e das soluções a serem testadas a cada 10 h. Para a quantificação das células planctônicas, uma alíquota de 1 mL foi retirada nos tempos de 2, 7, 26 e 36 h, procedendo diluições decimais, que foram plaqueadas pela técnica de microgotas em ágar padrão para contagem (PCA, Himedia, Índia). Após incubação por 12 h a 37 °C, a contagem de colônias foi feita em contador de colônias com lupa. Para a quantificação das células aderidas, o cupom de poliestireno foi removido dos frascos nos tempos de 2, 7, 26 e 36 h e lavados com tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4) (RYU e BEUCHAT, 2005), para retirada de células planctônicas. A seguir, o cupom foi colocado em um tubo de ensaio contendo 2 mL de PBS esterilizado (pH 7,4) e submetidos à ação de ultrassom por 30 min, para remoção das células aderidas. Essa suspensão foi homogeneizada e uma alíquota foi retirada para o preparo de diluições decimais, que foram plaqueados pela mesma técnica e nas mesmas condições descritas anteriormente.

4.7. Observação das células sésseis de *Salmonella* por microscopia

A adesão e a formação de biofilmes foram acompanhadas em cupons de poliestireno, deixados imersos no meio de cultura nas condições descritas no item 4.6. Após 2, 7, 26 e 36 h de cultivo, os cupons foram removidos dos frascos. Posteriormente, foram lavados com 1 mL de PBS (pH 7,4), deixados secar a temperatura ambiente e, em seguida, foram fixados por 3 min a temperatura ambiente com solução de Kirk Patrick. Em seguida, os cupons foram novamente lavados com 1 mL de PBS (pH 7,4), corados com laranja de acridina 0,04 % (m/v) por 5 min, lavados com 1 mL de PBS (pH 7,4) e deixados secar a temperatura ambiente, no escuro. Após 1 h de coloração, foi feita a observação no microscópio confocal de epifluorescência, modelo BX50 (Olympus, Japão), em aumento de 1.000 vezes e utilizando o filtro WB₂ (460 a 490 nm). Em cada

repetição, o comprimento de 10 células foi medido utilizando o programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Estados Unidos).

4.8. Extração de proteínas celulares de *Salmonella*

As células planctônicas de *Salmonella* foram obtidas de 30 mL de TSB, conforme descrito no item 4.3 após 7 h de incubação. Para a análise de proteínas das células do tratamento controle e daquelas do tratamento com C₁₂-AHL, foram coletados 30 mL de meio e acondicionados em tubos de centrifuga de 50 mL. O meio de cultura foi centrifugado (2.000 x g, 15 min, 4 °C, Sorvall, Estados Unidos) e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 1 mL de água destilada esterilizada, colocadas em microtubos de 1,5 mL, centrifugadas (9.500 x g, 30 min, 4 °C, Brikmann Instruments, Alemanha) e descartado o sobrenadante. O centrifugado foi resuspendido em 50 mM de bicarbonato de amônio, 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e foram adicionados 1 mL de uma mistura 2/1 de Trifluoroetanol/Clorofórmio (TFE/CHCl₃), agitando de forma intensa em agitador de tubos. Em seguida, a mistura foi mantida a 0 °C por 1 h em banho de ultrassom (100 W MSE 20 KHz), com agitações periódicas em agitador de tubos de 10 em 10 min. Após esse tempo, o material foi centrifugado (6.500 x g, 4 min, 4 °C, Brikmann Instruments, Alemanha) para obtenção de três fases, sendo coletada a fase superior (fase que contém as proteínas solúveis em TFE) e a fase central (fase que contém proteínas insolúveis em TFE), as quais foram secas em *SpeedVac* (Genevac, Inglaterra) e ressolubilizadas em 500 µL de uma mistura de 5 M de ureia, 2 M de tiourea, 4 % de 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano-sulfonato (CHAPS), 40 % TFE e 10 mM Tris-HCl (pH 8,8 - 9,0). As ligações dissulfeto das proteínas foram reduzidas por 1 h à temperatura ambiente com 500 mM de ditioneitol (DTT), posteriormente, a alquilação foi realizada adicionando 1 M de acrilamida (DESHUSSES *et al.*, 2003; EBANKS *et al.*, 2004; NUNN *et al.*, 2006). O extrato de proteínas foi precipitado com ácido tricloroacético 10 % (TCA) e mantido em gelo por 30 min. Em seguida, o material foi centrifugado (9.500 x g, 10 min, Brikmann Instruments, Alemanha), descartado o sobrenadante e o precipitado lavado três vezes com acetona gelada. Após evaporar a acetona, o precipitado foi resuspendido com 700 µL de uma mistura de 7 M de ureia, 2 M de tiourea e 2 % de CHAPS. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976).

4.9. Separação de proteínas de *Salmonella* por eletroforese bidimensional

As proteínas celulares foram separadas por eletroforese bidimensional (2-DE). As proteínas foram separadas na primeira dimensão de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF), em tiras de 7 cm com intervalo linear de pH de 3,0 a 10,0 imobilizado em gel de poliacrilamida (*Immobilized pH gradient – IPG – Immobiline™ DryStrip*, GE Healthcare, Suécia). Volumes correspondentes a 150 µg de proteínas celulares foram individualmente misturados com DTT 40 mM e 2 % de anfólito *IPG Buffer* pH 3 a 10 (GE Healthcare, Suécia), e completados para um volume final de 125 µL de tampão de reidratação (*Destreak Rehydration Solution*, GE Healthcare, Suécia). A reidratação das fitas seguiu-se a temperatura ambiente por 12 h. Após a reidratação, a focalização isoelétrica foi realizada no equipamento IPGphor III (GE Healthcare, Suécia) seguindo-se as etapas: 1) 300 V em passo único por 14 h; 2) 300 Vh em gradiente até 1000 V; 3) 2000 V em gradiente por 1 h; 4) 2000 Vh em passo único até 2000 V; 5) 3000 V em gradiente por 1:30 h; 6) 3000 Vh em passo único até 3000 V; 7) 5000 V em gradiente por 1:30 h; 8) 3000 Vh em passo único até 5000 V; 9) 200 V em passo único por 10 h. Concluída a IEF, as tiras foram armazenadas a -80 °C até realização da segunda dimensão.

Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 12 % na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com os pesos moleculares, utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970). As tiras foram previamente equilibradas em 5 mL de solução de equilíbrio (tris 75 mM pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30 %; SDS 2 % e azul de bromofenol 0,002 %) sob agitação por 15 min em duas etapas. Primeiramente, foi adicionado 1 % de DTT ao tampão de equilíbrio a fim de reduzir as proteínas e, em seguida, adicionou-se 2,5 % de iodoacetamida a fim de alquilar as proteínas. As tiras equilibradas foram colocadas no topo do gel de poliacrilamida e o marcador *Broad Range Bio-Rad* (6.500 – 200.000 kDa, Bio-Rad, Estados Unidos) e selados com *agarose sealing solution*. A corrida foi realizada em uma etapa inicial a 60 V e em, seguida, a 80 V até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. Terminada a corrida, os géis foram colocados em solução de fixação contendo ácido acético a 10 % (v/v) e metanol 50 % (v/v) por 30 min, corados com solução contendo sulfato de amônio 8 % (m/v), ácido fosfórico 0,8 % (v/v), azul de *Coomassie G-250* 0,08 % (v/v) e metanol 30 % por 72 h. Após essa etapa, os géis foram

lavados e conservados com ácido acético 5 % (v/v) até a eliminação completa do corante excedente.

4.10. Análise e predição das proteínas de *Salmonella*

Os géis foram digitalizados usando o *Image Scanner* III (GE Healthcare, Suécia) no modo de escaneamento transparente, resolução de 300 dpi, filtro de cor verde e com calibração atualizada. As imagens dos géis foram obtidas utilizando o programa *Labscan* (GE Healthcare, Suécia) e analisadas no programa *ImageMaster*TM 2D *platinum* 7.0 (GE Healthcare, Suécia). A detecção dos *spots* e a determinação do volume foram realizadas de modo automático pelo programa, adotando os seguintes parâmetros, *smooth* = 2, área mínima = 20 e saliência = 30. Os *spots* que apresentaram valores de probabilidade menores do que 0,05 na análise de variância (ANOVA) indicaram ser uma proteína diferencialmente expressa. A predição das proteínas diferencialmente expressas foi realizada segundo Hiller *et al.* (2006), utilizando o programa JVirGel 2.0 (JVirGel, Alemanha) com os dados disponíveis no UniProt, utilizando a ferramenta UniProtKB (*Protein Knowledgebase*, disponível em: <http://www.uniprot.org/>) e no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando a ferramenta Protein (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) para *S. enterica* sorovar Enteritidis PT4. O ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM) das proteínas diferencialmente expressas foram comparados com os das proteínas do banco de dados, aceitando-se uma variação de até 5,0 %.

4.11. Análise estatística dos dados

Em todos os experimentos foram realizadas três repetições com uma réplica para cada, exceto no descrito no item 4.5, em que para cada uma das três repetições foram realizadas oito réplicas. Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, sendo os valores de probabilidade menores do que 0,05 considerados estatisticamente significativos. As comparações foram feitas utilizando o aplicativo computacional GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Estados Unidos), sendo o erro padrão representado pela barra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência da presença de 50 nM de C₁₂-AHL e, ou de uma mistura de furanonas sobre o crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em TSB foi avaliada em anaerobiose a 37 °C por 8 h (Figura 3).

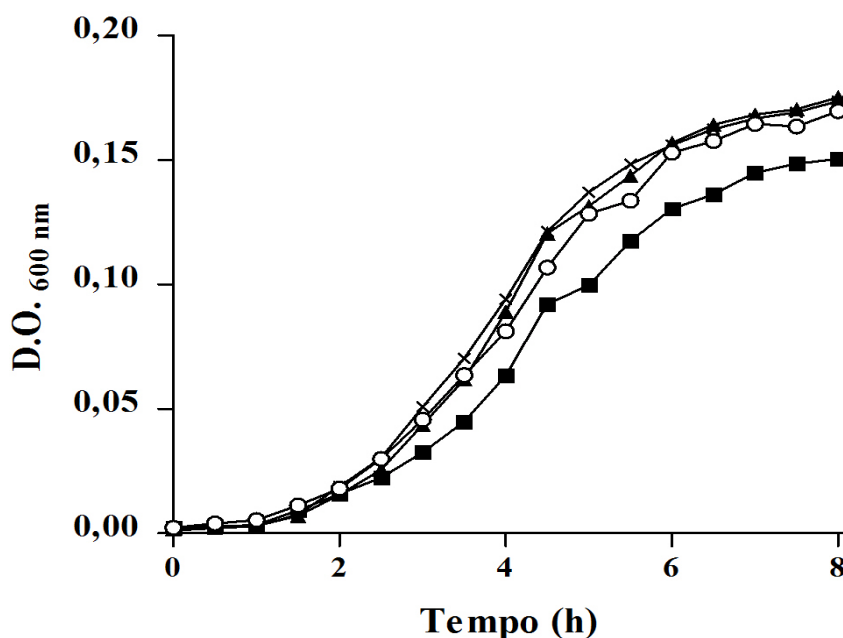


Figura 3. Crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 por 8 h em TSB em anaerobiose. Controle (—○—), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (—×—), na presença de 50 nM C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (—■—) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (—▲—).

A presença de 50 nM de C₁₂-AHL no meio TSB, usado para o cultivo de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em anaerobiose, não influenciou o crescimento do patógeno ao longo de 8 h de incubação (Figura 3). Foi observado que a densidade óptica máxima a 600 nm (D.O._{máx.}) ($0,173 \pm 0,014$) neste tratamento foi estatisticamente igual a do controle ($0,169 \pm 0,004$). Campos-Galvão (2012) também observou que a adição de 100 nM de cada uma das AHLs variando de C₆ a C₁₂-AHL não afetou o crescimento do mesmo patógeno. A concentração de 50 nM de C₁₂-AHL usada neste estudo é muito superior à concentração necessária para induzir a expressão do gene *sdiA* em *Salmonella* Typhimurium que, segundo Michael *et al.* (2001), dependendo da AHL avaliada, é de 1 nM. Porém, embora responda às AHLs, a proteína SdiA, receptora destes autoindutor-1 (AI-1), ainda não tem função estabelecida em *Salmonella* (DYSZEL *et al.*, 2010; SABAG-DAIGLE *et al.*, 2012). Em *E. coli*, a função de SdiA está bem estabelecida na formação de biofilme (LEE *et al.*, 2009).

A fim de comprovar a regulação de fenótipos pelo AI-1 em *Salmonella* Enteritidis PT4 578, o crescimento também foi avaliado na presença de uma mistura de furanonas. As furanonas são análogas as AHLs, mas são incapazes de promoverem a regulação gênica (RASMUSSEN *et al.*, 2000; ZHU e WINANS, 2001; HENTZER *et al.*, 2002, 2003; MANEFIELD *et al.*, 2002). A presença de 50 nM da mistura de furanonas não influenciou no crescimento bacteriano, sendo que a D.O._{máx} ($0,175 \pm 0,006$) na presença destes compostos foi estatisticamente igual a do controle ($0,169 \pm 0,004$). Janssens *et al.* (2008) observaram que o crescimento de *Salmonella* Typhimurium não foi influenciado em TSB a 16 °C por 12 h com adição de 50, 60 e 100 µM de diferentes furanonas. A presença da mistura de furanonas juntamente com C₁₂-AHL resultou em uma D.O._{máx} ($0,150 \pm 0,003$), menor do que as encontradas nos tratamentos com adição separada de furanonas e C₁₂-AHL e no tratamento (Figura 3).

O efeito da C₁₂-AHL e furanonas sobre a motilidade em massa ou por espalhamento (*swarming*) e a motilidade por contração ou por espasmos (*twitching*) de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foi determinado em anaerobiose utilizando 0,7 e 1,0 % (m/v) de ágar adicionados em TSB, respectivamente (Figuras 4 e 5). Observou-se que não houve motilidade em massa ou por espalhamento (*swarming*) das células (Figura 4) em nenhum dos tratamentos avaliados, uma vez que não foi observado aumento do diâmetro das colônias de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Neste tipo de motilidade ocorre uma movimentação multicelular na presença de uma mistura de polissacarídeos e de proteínas tensoativas. Este processo é dependente do movimento dos flagelos, os quais funcionam como propulsores helicoidais dirigidos por um motor biológico em uma superfície sólida (HARSHEY e MATSUYAMA, 1994; FRASER e HUGHES, 1999; KEARNS, 2010). Em *E. coli*, o AI-2 aumentou a motilidade células por aumentar a expressão de cinco genes de motilidade (GONZÁLEZ BARRIOS *et al.*, 2006). Por outro lado, o mesmo patógeno na presença de furanona mostrou inibição da formação de biofilme e da motilidade em massa ou por espalhamento (*swarming*), porém a presença de furanona não afetou a motilidade por natação (*swimming*) (REN *et al.*, 2001). Contudo, os resultado encontrados por Janssens *et al.* (2008) mostraram que a motilidade por natação (*swimming*) de *Salmonella* Typhimurium foi retardada quando cultivada em TSB com 0,25 % (m/v) de ágar adicionado de 50 µM de furanona e incubado a 16 °C durante 5 dias. Além disso, eles observaram que o número de flagelos é menor na presença da mesma concentração de furanona e por análise de microarranjo,

notaram que há uma deficiência na montagem dos flagelos funcionais para motilidade e formação de biofilme.

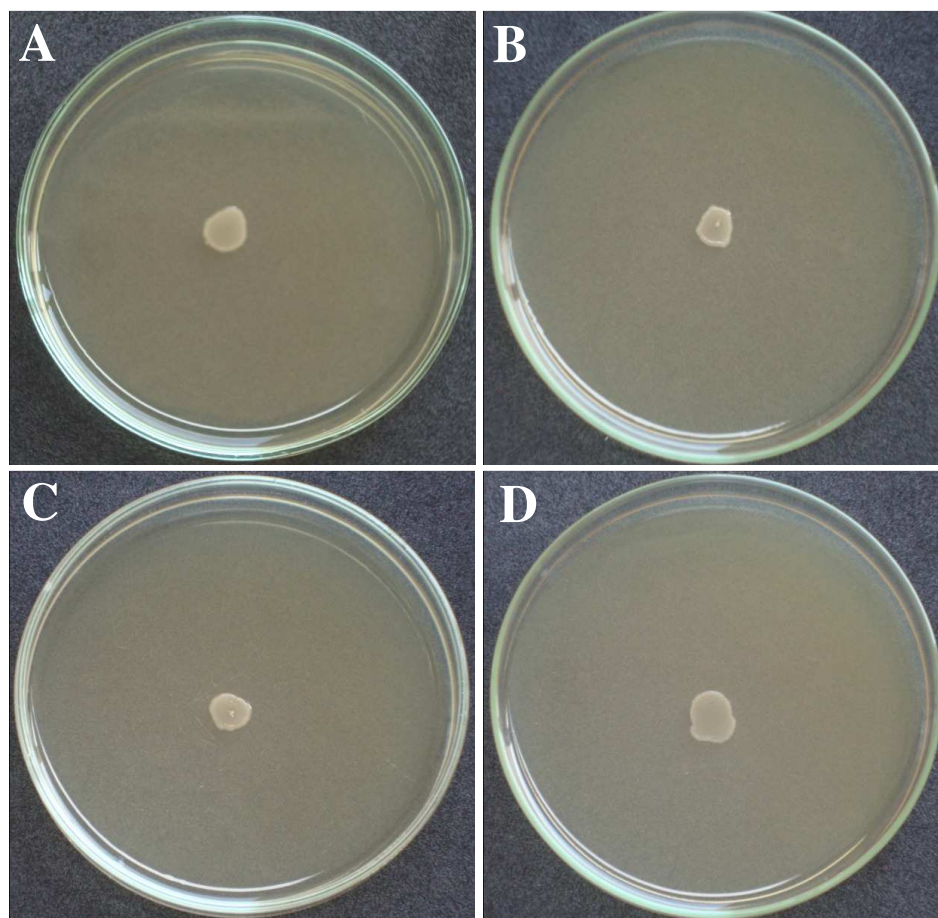


Figura 4. Colônias de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 com 48 h de cultivo em TSB adicionado de 0,7 % (m/v) de ágar em anaerobiose para determinar a motilidade em massa ou por espalhamento (*swarming*). Controle (A), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (B), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (C) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (D).

Os resultados encontrados por Lillard (1985) constataram que não houve diferença entre a adesão de micro-organismos flagelados (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Gallinarum, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus*) e não flagelados (*Micrococcus*) em pele de aves. Segundo Zottola e Sasahara (1994), os flagelos conferem motilidade aos micro-organismos ajudando a direcioná-los a uma fonte de nutriente e facilitam a adesão inicial em superfícies bióticas e abióticas.

Também foi observado que não houve motilidade por contração ou por espasmos (*twitching*) (Figura 5) em nenhum dos tratamentos, uma vez que não se observou aumento do diâmetro das colônias de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Esse

tipo de motilidade ocorre pela extensão e retração do *pili* do tipo IV e, conseqüentemente, impulsão da bactéria pela superfície sólida (HENRICHSEN, 1972; KEARNS, 2010).

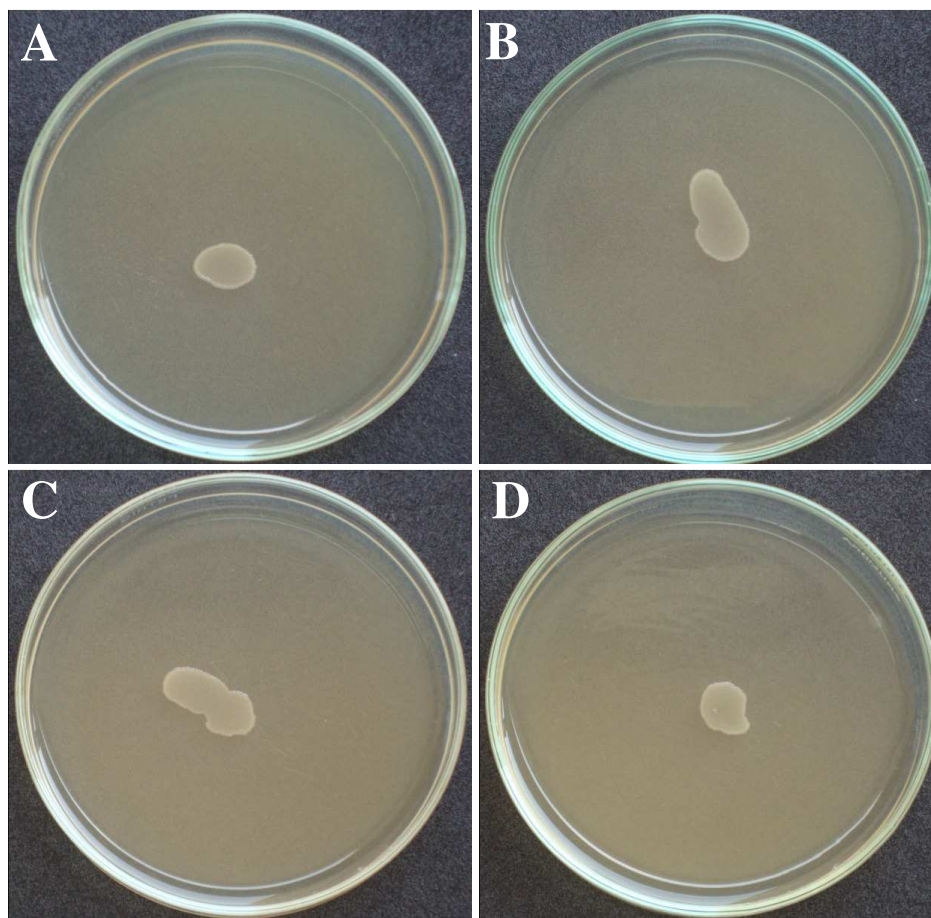


Figura 5. Colônias de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 com 48 h de cultivo em TSB adicionado de 1,0 % (m/v) de ágar em anaerobiose para determinar a motilidade por contração ou por espasmos (*twitching*). Controle (A), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (B), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (C) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (D).

Dependendo da motilidade celular, a adesão inicial das células bacterianas às superfícies pode ser classificada em passiva ou ativa. A adesão passiva é dirigida pela gravidade, difusão e dinâmica de fluidos. Já a adesão ativa é facilitada pelas propriedades celulares como flagelo, *pilus*, cápsula e cargas de superfície (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; PALMER *et al.*, 2007). Com base nos resultados de motilidade em massa ou por espalhamento (*swarming*) e de motilidade por contração ou por espasmos (*twitching*) observados no presente trabalho, nota-se que a presença de C₁₂-AHL e de furanonas não conferiu motilidade às células nas condições adotadas.

Os experimentos de adesão e formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis PT4 578 foram realizados em anaerobiose, uma vez que a formação de biofilme em anaerobiose é pouco estudada e foi escolhida por simular o ambiente intestinal, local onde a infecção é iniciada. A formação de biofilme foi acompanhada por 36 h de cultivo em TSB com substituição do meio, da suspensão de células ativadas e das soluções a serem testadas, a cada 10 h. Estas substituições ao longo do tempo de incubação foram realizadas levando-se em consideração a cinética de formação de biofilme (TAKHISTOV e GEORGE, 2004). Uma vez que nas condições laboratoriais não há matéria orgânica aderida à superfície (POULSEN, 1999), se torna necessária a formação inicial de um microambiente pela adsorção de algumas células à superfície com a produção de exopolissacarídeos. Este microambiente se torna um local de escolha para adesão de outras células (TAKHISTOV e GEORGE, 2004). Desse modo, as primeiras 10 h do experimento foram para a formação do microambiente na superfície do poliestireno e as substituições do meio e da suspensão de células forneceram nutrientes e células que teriam o microambiente como local de escolha para a adesão.

O efeito da C₁₂-AHL e das furanonas sobre o potencial de adesão e a formação de biofilme em microplacas foi avaliado pela determinação da densidade óptica do extrato de cristal violeta a 590 nm (Figura 6).

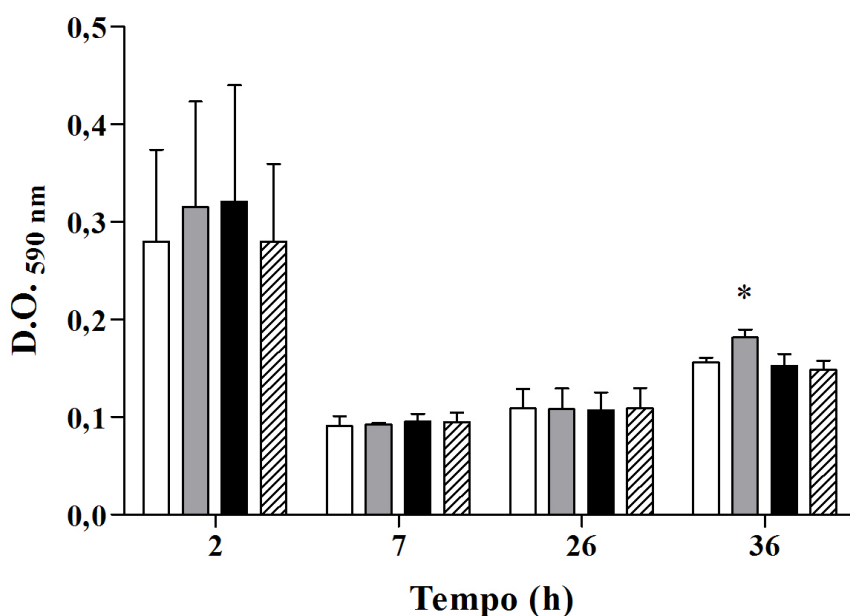


Figura 6. Efeito de AI-1 na adesão e na formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Densidade óptica a 590 nm do extrato de cristal violeta nos tempos de 2, 7, 26 e 36 h de cultivo em TSB de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em anaerobiose. Controle (□), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (■), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (■) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (▨). O meio, a suspensão de células ativadas e as soluções a serem testadas foram substituídos a cada 10 h. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A densidade óptica do extrato de cristal violeta a 590 nm não foi influenciada ($p > 0,05$) pelos tratamentos nos tempos de 2, 7 e 26 h. Contudo, no tempo de 36 h de cultivo na presença de 50 nM de C₁₂-AHL houve maior densidade óptica a 590 nm (D.O. 590 nm) em relação aos outros tratamentos ($p < 0,05$).

O acompanhamento do crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em microplacas, por densidade óptica a 600 nm (Figura 7) confirmou resultados obtidos anteriormente por contagem de células viáveis (Figura 3), quando se verificou que tanto a adição de 50 nM de C₁₂-AHL ou de furanonas ao meio TSB não afetaram o crescimento bacteriano (Figura 7).

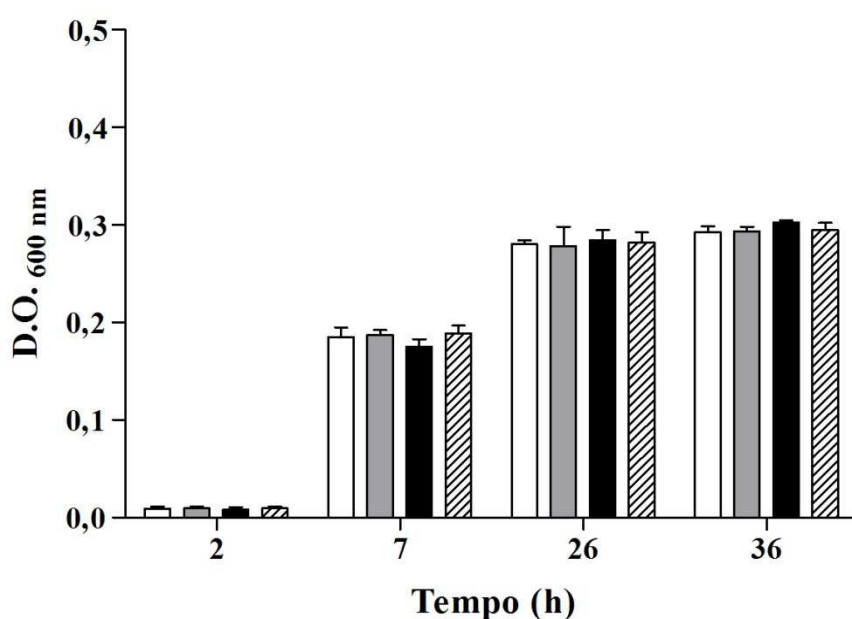


Figura 7. Efeito de AI-1 no crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Densidade óptica a 600 nm da cultura de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 nos tempos de 2, 7, 26 e 36 h de cultivo em TSB em anaerobiose. Controle (□), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (■), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (■) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (▨). O meio, a suspensão de células ativadas e as soluções a serem testadas foram substituídos a cada 10 h.

O efeito da C₁₂-AHL e furanonas sobre potencial de adesão e formação de biofilme em microplacas foi calculado pela razão entre a densidade óptica do extrato de cristal violeta a 590 nm (Figura 6) e a densidade óptica da cultura de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 a 600 nm (Figura 7), como mostrado na Figura 8.

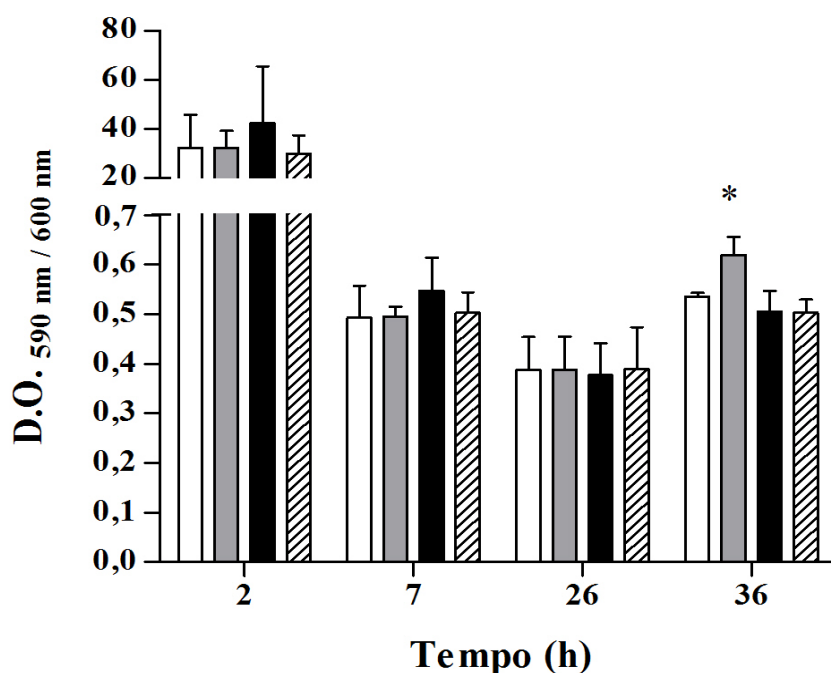


Figura 8. Efeito de AI-1 na adesão e na formação de biofilme em razão ao crescimento de *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Razão entre a densidade óptica do extrato de cristal violeta (590 nm) e a densidade óptica da cultura de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 (600 nm) nos tempos de 2, 7, 26 e 36 h de cultivo em TSB em anaerobiose. Controle (□), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (■), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (■) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (▨). O meio, a suspensão de células ativadas e as soluções a serem testadas foram substituídos a cada 10 h. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Durante as 36 h em que se acompanhou o potencial de adesão e formação de biofilme de *Salmonella* PT4 578 em superfície de poliestireno não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos controle e aqueles adicionados de C₁₂-AHL e, ou furanonas, nos tempos de 2, 7 e 26 h de incubação. Somente após 36 h de cultivo na presença de 50 nM de C₁₂-AHL constatou-se efeito positivo deste autoindutor sobre a formação de biofilme ($p < 0,05$). Estes resultados confirmam os obtidos por Campos-Galvão (2012), que constatou que o cultivo de *Salmonella* Enteritidis PT4 578, em TSB e em anaerobiose, na presença de 50 nM de cada uma das AHLs variando de C₆ a C₁₂-AHL aumentou o potencial de adesão em poliestireno e, dentre as AHLs avaliadas, a C₁₂-AHL apresentou maior indução deste fenótipo a partir de 72 h de cultivo.

O cultivo por 36 h na presença de 50 nM da mistura de furanonas e desta mistura acrescida de C₁₂-AHL confirmaram o efeito antagonista das furanonas em relação as AHLs, uma vez que não houve aumento significativo de células aderidas nem de formação de biofilme em poliestireno na presença destes análogos de AI-1. Estes dados

corroboram com os encontrados por Janssens *et al.* (2008), que observaram inibição da formação de biofilme por *Salmonella* Typhimurium em microplaca de poliestireno após cultivo por 48 h a 16 °C na presença de 25, 50 e 100 µM de diferentes furanonas, sem adição de AHL.

Com 2 h de cultivo todos os tratamentos apresentaram maior absorvância a 590 nm do cristal violeta indicando que houve possivelmente maior adesão (Figura 8). Pui *et al.* (2011) avaliaram a formação de biofilme por *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Typhimurium cultivada em TSB pela técnica de microplacas. Estes observaram uma absorvância máxima a 590 nm com 12 h de cultivo e após esse tempo houve uma redução gradativa da absorvância. Resultados semelhantes foram encontrados por Karaca *et al.* (2013) ao analisarem a formação de biofilme por 25 sorotipos de *Salmonella* em meio Luria Bertani (LB) pela técnica de microplaca. Estes autores notaram que *Salmonella* Typhimurium não pode ter a formação de biofilme descrita por um modelo matemático de predição devido à formação de biofilme ser maior nas primeiras 12 h de cultivo e diminuir após esse tempo.

O comprimento das células aderidas nos cupons de poliestireno foi mensurado a partir das imagens da microscopia confocal de epifluorescência (Figura 9).

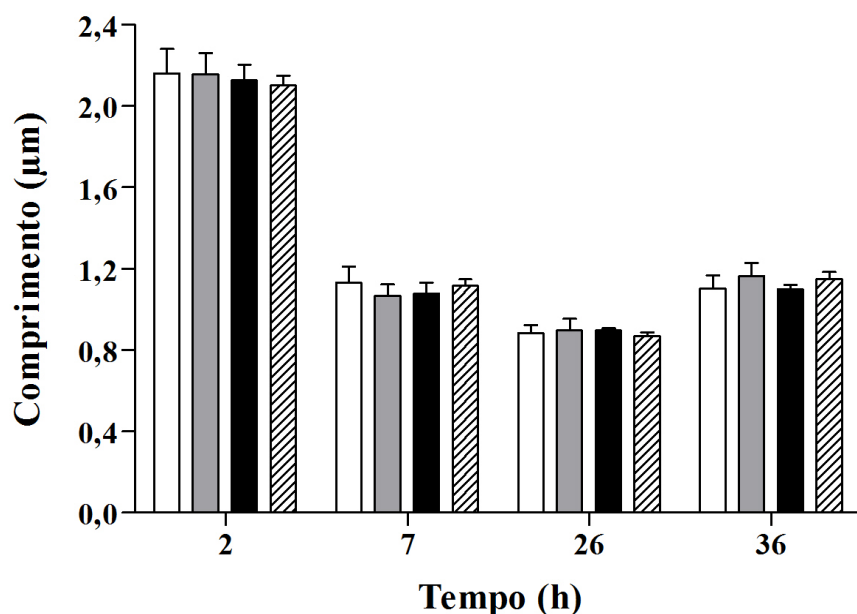


Figura 9. Comprimento das células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 aderidas em cupons de poliestireno, expressa em µm, nos tempos de 2, 7, 26 e 36 h de cultivo em TSB em anaerobiose. Controle (□), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (■), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (■) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (▨). O meio, a suspensão de células ativadas e as soluções a serem testadas foram substituídos a cada 10 h.

Observa-se diferença no tamanho das células aderidas no poliestireno em função do tempo, sendo que células cultivadas por 2 h foram quase duas vezes mais alongadas do que as células nos demais tempos de cultivo (Figura 9). A partir da Figura 3 nota-se que até 2 h de cultivo as células se encontram em fase da adaptação (fase lag) e nos demais tempos avaliados, as células estão em fase estacionária. Segundo White (2007), células em fase lag estão se adaptando as novas condições para iniciar a divisão celular e por isso, são mais alongadas do que as células em fase estacionária. Além disso, as células em fase estacionária desencadeiam respostas adaptativas as limitações de nutrientes, como a redução do tamanho celular, mudanças das propriedades da superfície celular (relacionadas à hidrofobicidade e adesão), dos fosfolípidios de membrana, da composição de proteínas, da atividade metabólica e resistência a estresses ambientais. Essas mudanças celulares influenciadas pelo tempo de cultivo podem justificar a maior retenção do cristal violeta pelas células com 2 h de cultivo quando comparada com a retenção nos tempos de 7, 26 e 36 h.

O efeito da C₁₂-AHL e furanonas sobre a adesão e formação de biofilme também foi avaliado pela enumeração das células planctônicas (Figura 10) e das células aderidas em cupons de poliestireno (Figura 11).

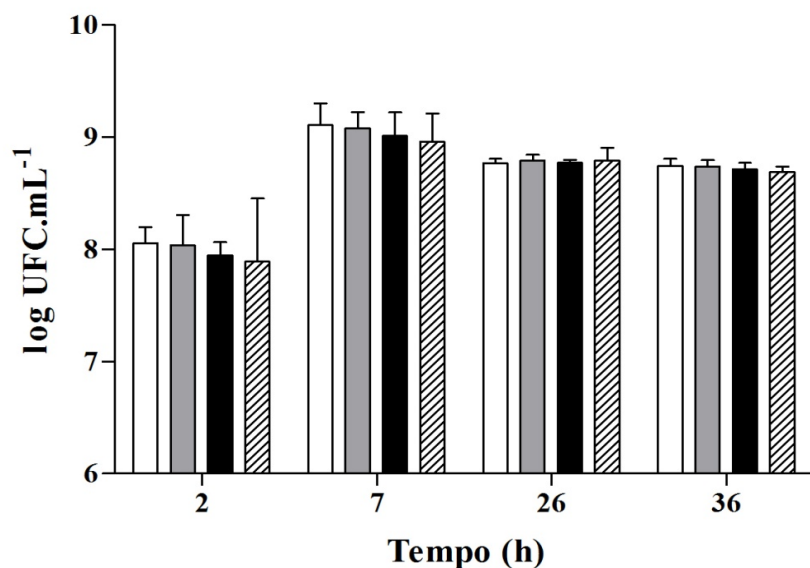


Figura 10. Número de células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis PT4 578, expressa em log UFC.mL⁻¹, nos tempos 2, 7, 26 e 36 h de cultivo em TSB em anaerobiose. Controle (□), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (■), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (■) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (▨). O meio, a suspensão de células ativadas e as soluções a serem testadas foram substituídos a cada 10 h.

O cultivo de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 durante 36 h em anaerobiose mostrou que não houve diferença ($p > 0,05$) no número de células planctônicas entre os tratamentos (Figura 10).

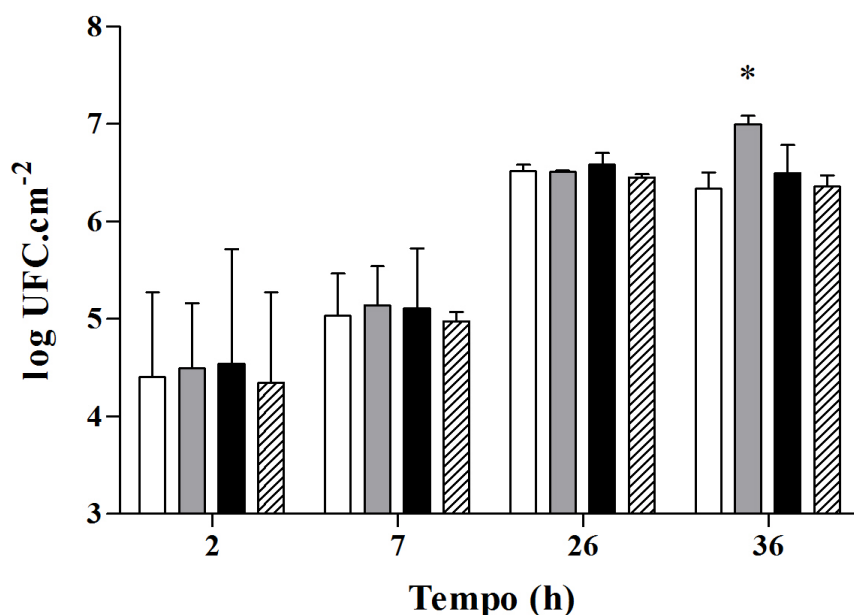


Figura 11. Número de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 aderidas em cupons de poliestireno, expressa em $\log \text{UFC.cm}^{-2}$, nos tempos de 2, 7, 26 e 36 h de cultivo em TSB em anaerobiose. Controle (□), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (■), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (■) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (▨). O meio, a suspensão de células ativadas e as soluções a serem testadas foram substituídos a cada 10 h. * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

O número de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 aderidas nos cupons de poliestireno não foi diferente ($p > 0,05$) nos tempos de 2, 7 e 26 h, indicando que C₁₂-AHL não tem influência na adesão inicial. Todavia, a presença de 50 nM de C₁₂-AHL mostrou efeito positivo sobre a formação de biofilme em poliestireno no tempo de 36 h de incubação. Nesta condição, foi constatado aumento de, aproximadamente, um ciclo log ($p < 0,05$) no número de células de *Salmonella* Enteritidis PT4 aderidas aos cupons de poliestireno. Tais resultados evidenciam efeito antagonista das furanonas com 36 h de cultivo, mesmo na presença de C₁₂-AHL e confirmam os resultados encontrados na análise de quantificação do potencial de adesão e formação de biofilme (Figuras 6, 7 e 8).

Nos cupons de poliestireno imersos na cultura de *Salmonella* Enteritidis PT4 por 2, 7 e 26 h de incubação não foi possível constatar diferença na adesão e nem a presença de estruturas de biofilme nos diferentes tratamentos nos cupons observados por microscopia confocal de epifluorescência. Nestes tempos de incubação e tratamentos, foi possível notar que haviam células aderidas de modo espaçado e também agrupadas, mas sem sobreposição das células e sem evidências de produção de estruturas de biofilmes, como mostrado no tempo de 2 h (Figura 12).

Os resultados do potencial de adesão e formação de biofilme em microplacas com 2 h de cultivo (Figura 8) não corroboram com a enumeração de células aderidas (Figura 11) e com as imagens da microscopia confocal de epifluorescência (Figura 12). Estes resultados mostram que não houve maior adesão das células com 2 h em relação aos demais tempos analisados. Possivelmente, a maior retenção do cristal violeta pelas células com 2 h de cultivo está relacionada com a fase de crescimento.

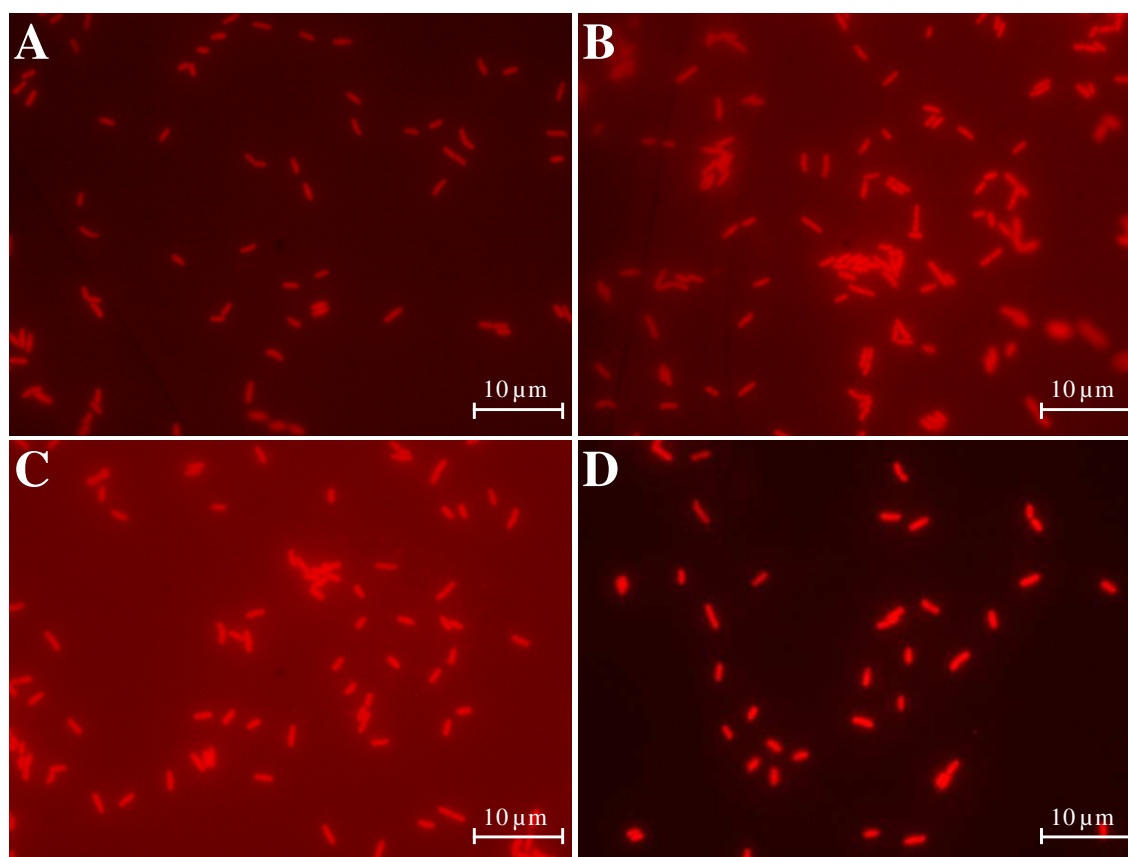


Figura 12. Microscopia confocal de epifluorescência de adesão e biofilme formado por *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em cupons de poliestireno de cultivo em TSB em anaerobiose por 2 h. Controle (A), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (B), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (C) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (D). Aumento de 1.000 vezes e filtro WB₂.

A Figura 13 mostra as imagens dos cupons de poliestireno em microscopia confocal de epifluorescência com 36 h de incubação nos diferentes tratamentos, evidenciando o efeito estimulador da C₁₂-AHL sobre a formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis PT4.

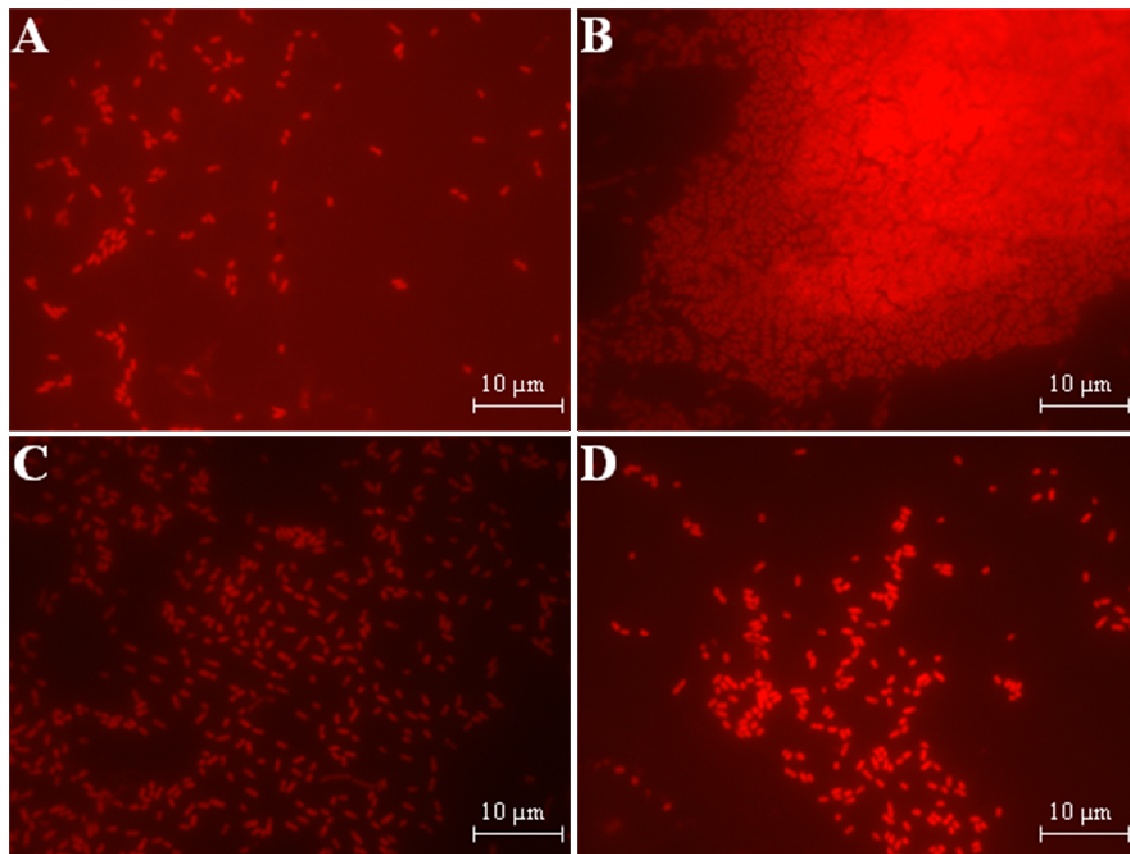


Figura 13. Microscopia confocal de epifluorescência de adesão e biofilme formado por *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em cupons de poliestireno de cultivo em TSB em anaerobiose por 36 h. Controle (A), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (B), na presença de 50 nM de C₁₂-AHL e de 50 nM da mistura de furanonas (C) e na presença de 50 nM da mistura de furanonas (D). O meio, a suspensão de células ativadas e as soluções a serem testadas foram substituídos a cada 10 h. Aumento de 1.000 vezes e filtro WB₂.

Na ausência de C₁₂-AHL e de furanonas (Figura 13 A), assim com na presença de furanonas (Figura 13 C e D), houve adesão das células de modo espaçado e também agrupado. Já quando os cupons de poliestireno foram imersos por 36 h no cultivo de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 acrescido de C₁₂-AHL houve a formação de biofilme, sendo possível notar a sobreposição das células formando multicamadas indicando a provável presença de EPS (Figura 13 B). Estes resultados confirmam os obtidos por Campos-Galvão (2012) que observou em microscopia eletrônica de varredura que o cultivo de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 por 36 h em meio contendo uma mistura de C₆ a C₁₂-AHLs resultou em grande número de células aderidas nos cupons de

poliestireno com a presença de exopolissacarídeo e, na presença de C₁₂-AHL haviam células mais agregadas formando multicamadas característica dos biofilmes.

A presença de furanonas inibiu o efeito estimulador da formação de biofilme por C₁₂-AHL (Figura 13 C, D) e, estes dados também corroboram com os observados por Campos-Galvão (2012) que descreveu que células de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 na presença de furanonas aderiram ao poliestireno de forma espaçada e sem formação de estruturas características de biofilme.

Considerando os resultados obtidos de potencial de adesão e formação de biofilme em microplacas (Figura 8), de enumeração de células aderidas (Figura 11) e das imagens obtidas em microscopia confocal de epifluorescência (Figura 13) observa-se o efeito positivo de C₁₂-AHL sobre a formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis PT4 578 em anaerobiose. Este resultado sugere que, na presença de bactérias capazes de produzir AHLs, *Salmonella* pode induzir a formação de biofilme. Essa mudança de estilo de vida, de células planctônicas para células aderidas ou sésseis, pode conferir vantagem competitividade a esse patógeno, como sobreviver e se adaptar às condições de estresse no meio (HAMILTON *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2010; CAMPOS-GALVÃO, 2012).

Outro resultado que pode ser observado é o efeito antagonista das furanonas, uma vez que, quando uma mistura de furanonas foi adicionada ao meio juntamente com C₁₂-AHL, não houve a formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Enteritidis PT4 578. Este efeito antagonista das furanonas poderia ser explorado em vários setores da indústria de alimentos para competir e impedir que as AHLs produzidas por outros micro-organismos se liguem a SdiA e, conseqüentemente, ativem genes de formação de biofilme (RASMUSSEN *et al.*, 2000; HENTZER *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2004; JANSSENS *et al.*, 2008; CAMPOS-GALVÃO, 2012).

Para contribuir com a compreensão do efeito de C₁₂-AHL sobre *Salmonella* Enteritidis PT4 578, este patógeno foi cultivado na presença e na ausência deste autoindutor, as proteínas celulares foram extraídas e separadas por eletroforese bidimensional (2-DE) e os géis 2-DE obtidos dos dois tratamentos foram comparados (Figuras 14 e 15).

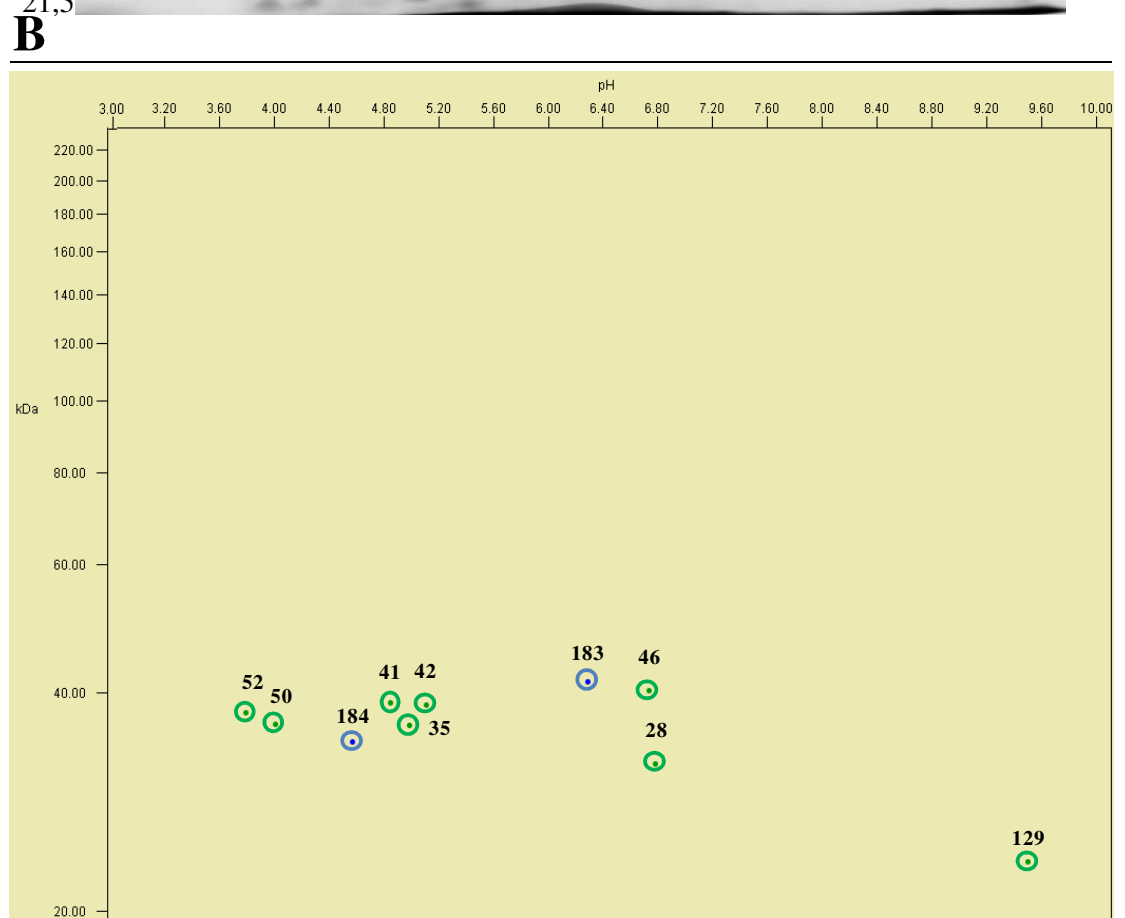
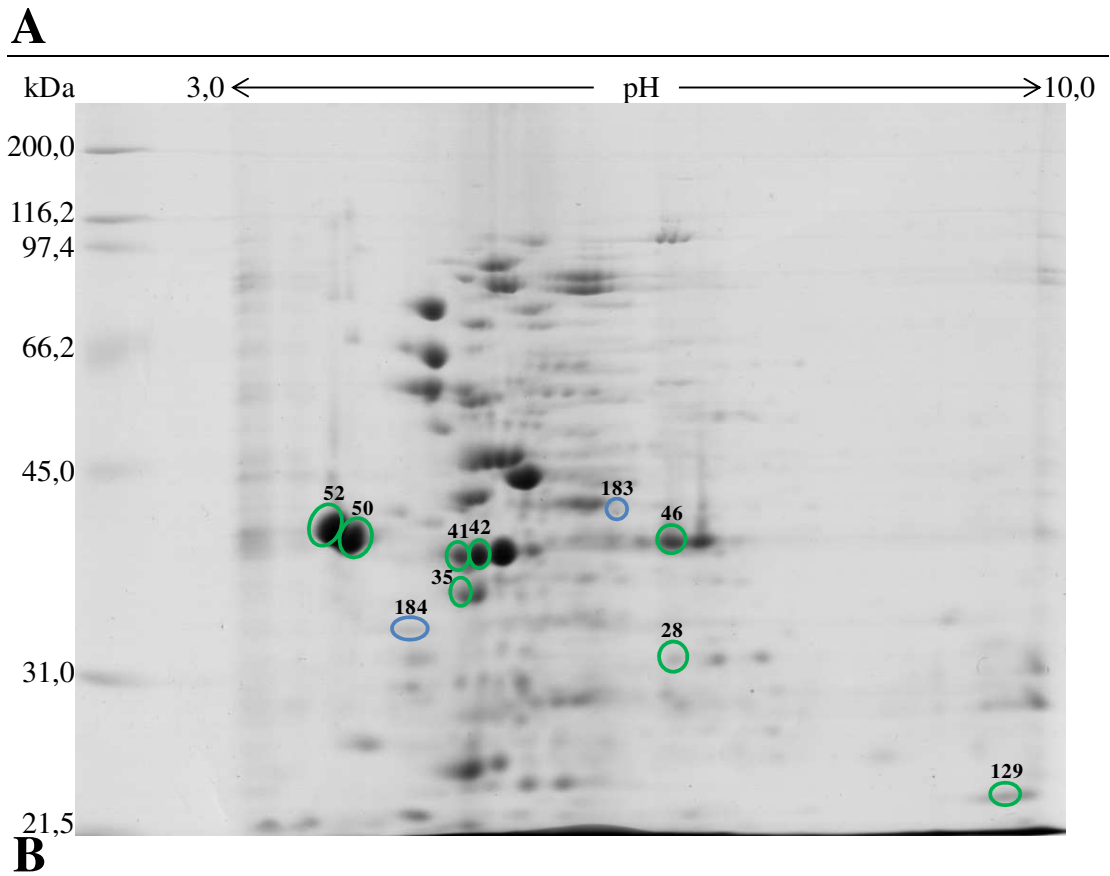


Figura 14. Gel 2-DE das proteínas celulares de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 cultivada em estado planctônico, por 7 h em TSB em anaerobiose, na ausência de C₁₂-AHL. Gel real (A) e gel *in silico* (B), sendo as proteínas diferencialmente expressas marcadas com círculos coloridos: somente no controle (○) e as com maior expressão no controle (○).

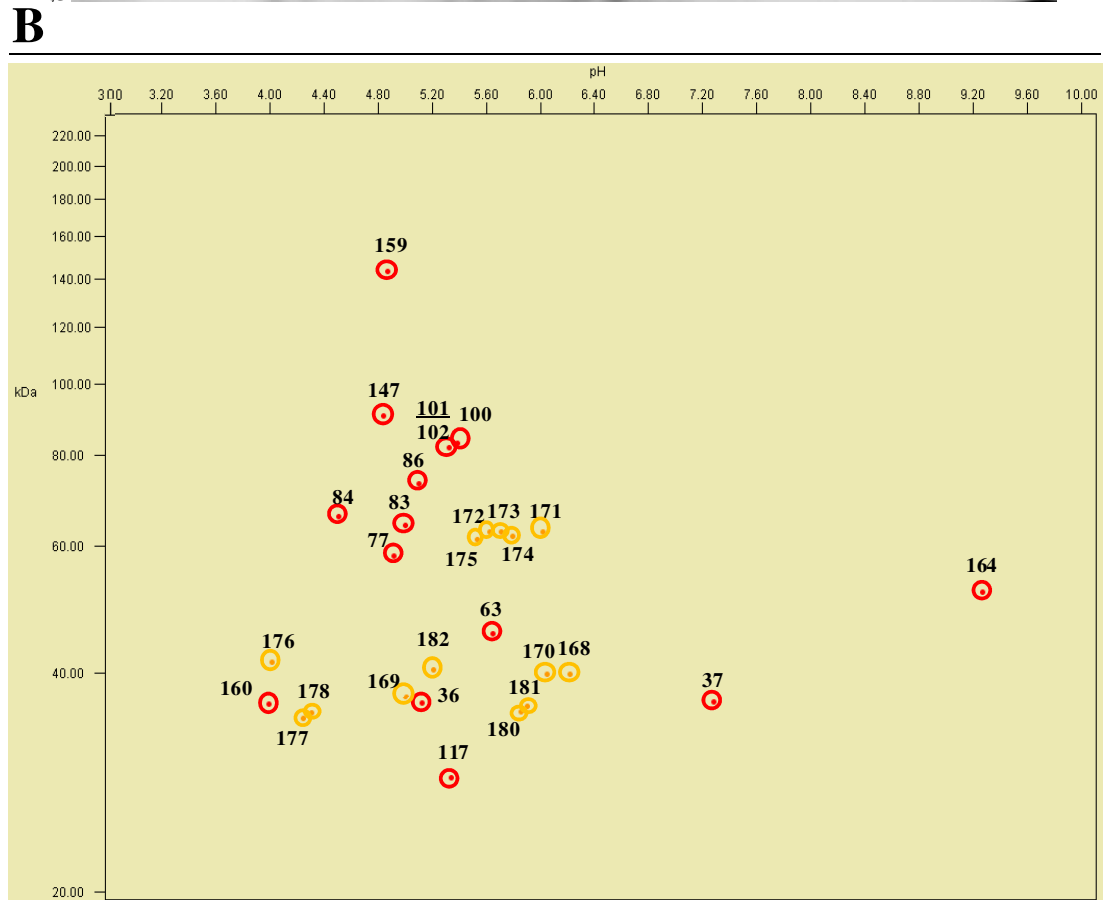
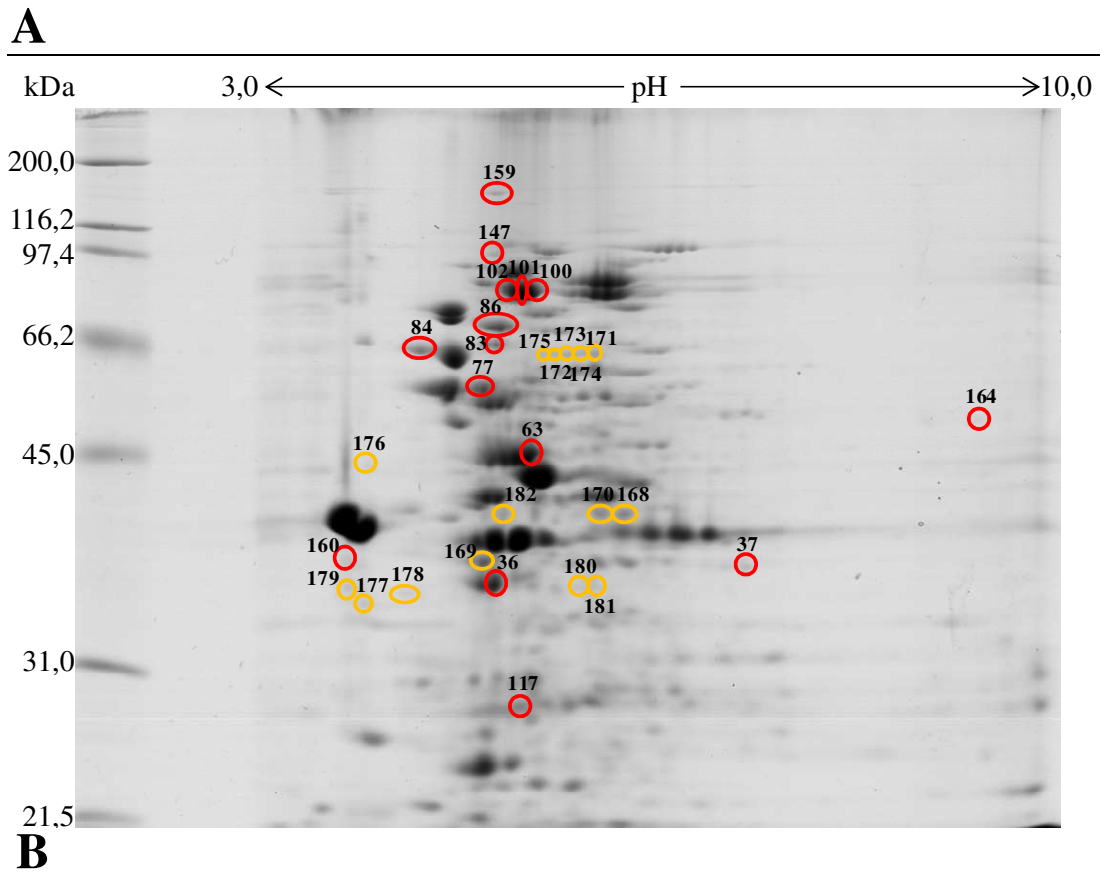


Figura 15. Gel 2-DE das proteínas celulares de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 cultivada em estado planctônico, por 7 h em TSB em anaerobiose, na presença de C₁₂-AHL. Gel real (A) e gel *in silico* (B), sendo as proteínas diferencialmente expressas marcadas com círculos coloridos: somente com C₁₂-AHL (○) e as com maior expressão com C₁₂-AHL (○).

A partir da comparação dos géis 2-DE das proteínas celulares na ausência e na presença de C₁₂-AHL, foram identificados 185 *spots* (Figuras 14 e 15). Destes, 40 proteínas foram diferencialmente expressas ($p < 0,05$), sendo que duas foram expressas somente no controle (○) e oito foram expressas tanto na ausência como a presença de C₁₂-AHL, porém com maior expressão no tratamento controle (○) (Figura 14 A). Do restante (Figura 15 A), 15 foram expressas somente na presença de 50 nM de C₁₂-AHL (○) e as outras 15 em ambas, mas com maior expressão na presença de C₁₂-AHL (○). O Diagrama de Venn mostra a distribuição das proteínas (Figura 16).

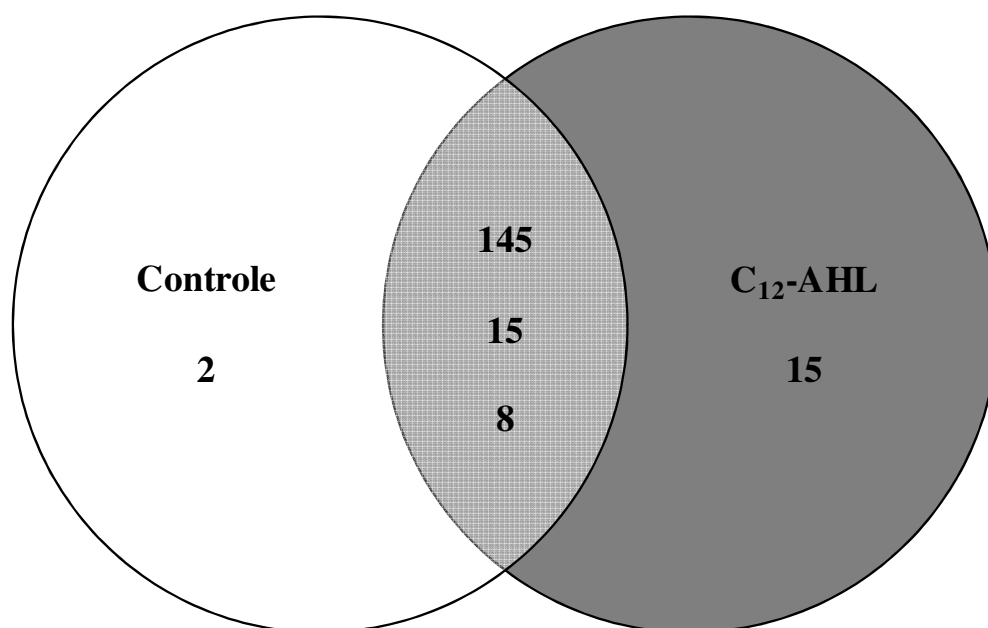


Figura 16. Diagrama de Venn mostrando a distribuição das proteínas celulares de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 cultivada em estado planctônico, por 7 h em TSB em anaerobiose, na ausência e na presença de C₁₂-AHL.

O ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM) de cada proteína diferencialmente expressa foram determinados. Posteriormente, por comparação com os bancos de dados, as proteínas foram preditas e foram classificadas quanto à amostra e à sua função na célula (Tabela 1). Das 40 proteínas diferencialmente expressas, apenas o *spot* de número 179 não foi possível de ser predita nenhuma proteína com variação de até 5,0 % em pI e MM (Tabela 1). Segundo Di Cagno *et al.* (2011), a expressão global de proteínas entre células bacterianas cultivadas na presença e na ausência de AIs do sistema *QS* é totalmente diferente, o que leva à regulação de fenótipos, como a formação de biofilme e fatores de virulência. Estes autores também destacaram que a proteômica é uma importante ferramenta para estudo dos sistemas de *QS*, porém ainda pouco utilizada.

Tabela 1. Predição das proteínas celulares diferencialmente expressas (ANOVA, $p < 0,05$) por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 no tratamento controle (sem C₁₂-AHL) e no tratamento com C₁₂-AHL. A predição foi feita por comparação do ponto isoelétrico (pI) e da massa molecular (MM) das proteínas encontradas com os das proteínas do UniProt e as do NCBI. Variação de até 5,0 % foi aceita para pI e MM.

N.º do <i>spot</i>	Amostra	pI ± VR (unidades de pH)	MM ± VR (kDa)	Gene	Locus (UniProt/NCBI)	Proteínas preditas		
						Nome	Localização	Função
46	Controle (ambas)	6,73 ± 0,12	39,65 ± 0,71	<i>yfiN</i>	SEN2593/ YP_002244671	Proteína hipotética de membrana	Membrana	Biossíntese
28	Controle (ambas)	6,77 ± 0,07	32,19 ± 0,32	SEN1433	SEN1433/ YP_002243534	Hipotética hexanoato desidrogenase	Citoplasma	Metabolismo energético
35	Controle (ambas)	4,96 ± 0,04	35,91 ± 0,29	<i>proV</i>	SEN2654/ YP_002244729	Proteína de ligação ao ATP do sistema de transporte de prolina e glicina betaína	Membrana	Transporte
42	Controle (ambas)	5,10 ± 0,03	38,58 ± 0,23	<i>emrA</i>	SEN2659/ YP_002244734	Proteína A associada à resistência a multidrogas	Membrana	Transporte
50	Controle (ambas)	4,03 ± 0,10	39,65 ± 0,99	SEN1522	SEN1522/ YP_002243621	Proteína de membrana externa SEN1522	Membrana	Transporte
52	Controle (ambas)	3,86 ± 0,06	40,48 ± 0,61	<i>ompN</i>	SEN1575/ YP_002243676	Proteína de membrana externa	Membrana	Transporte
129	Controle (ambas)	9,52 ± 0,10	23,45 ± 0,23	SEN0364	SEN0364/ YP_002242514	Proteína não caracterizada	Desconhecida	Desconhecida
41	Controle (ambas)	4,91 ± 0,07	38,58 ± 0,58	SEN2255	SEN2255/ YP_002244343	Proteína hipotética da família mandelato racemase (MR) e enzima muconato lactonizante (MLE)	Desconhecida	Desconhecida
183	Controle	6,27 ± 0,05	41,74 ± 0,33	<i>accC</i>	SEN3214/ YP_002245279	Biotina carboxilase (Acetil-CoA carboxilase)	Citoplasma	Biossíntese
184	Controle	4,47 ± 0,11	33,88 ± 0,85	SEN0267	SEN0267/ YP_002242428	Proteína hipotética conservada da Ilha de Patogenicidade	Desconhecida	Desconhecida

Tabela 1. Continuação.

N.º do <i>spot</i>	Amostra	pI ± VR (unidades de pH)	MM ± VR (kDa)	Gene	Locus (UniProt/NCBI)	Proteínas preditas		
						Nome	Localização	Função
159	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,09 ± 0,25	150,20 ± 7,51	<i>rpoB</i>	SEN3937/ YP_002245982	Subunidade beta da RNA polimerase direcionada por DNA	Cromossomo	Metabolismo do DNA
63	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,42 ± 0,05	46,91 ± 0,45	<i>yneI</i>	SEN1527/ YP_002243626	Proteína hipotética oxidoreductase (Succinato-semialdeído desidrogenase)	Citoplasma	Metabolismo energético
100	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,41 ± 0,05	82,98 ± 0,83	<i>pflF</i>	SEN0789/ YP_002242929	Proteína hipotética formato acetiltransferase 3	Citoplasma	Metabolismo energético
101	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,31 ± 0,07	82,98 ± 1,08	<i>pflD</i>	SEN3908/ YP_002245955	Formato acetiltransferase 2 (Piruvato formato liase 2)	Citoplasma	Metabolismo energético
102	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,21 ± 0,13	82,98 ± 2,07	<i>pflD</i>	SEN3908/ YP_002245955	Formato acetiltransferase 2 (Piruvato formato liase 2)	Citoplasma	Metabolismo energético
36	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,10 ± 0,05	36,03 ± 0,36	SEN3354	SEN3354/ YP_002245419	Proteína hipotética glicerol desidrogenase	Desconhecida	Metabolismo energético
86	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,09 ± 0,05	72,25 ± 0,72	SEN0041	SEN0041/ YP_002242208	Proteína hipotética glicosil hidrolase	Desconhecida	Metabolismo energético
117	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,34 ± 0,05	28,94 ± 0,29	<i>pipB</i>	SEN0952/ YP_002243083	Proteína da Ilha de Patogenicidade	Desconhecida	Patogenicidade
84	C ₁₂ -AHL (ambas)	4,47 ± 0,04	65,81 ± 0,66	<i>cheA</i>	SEN1082/ YP_002243209	Proteína CheA	Citoplasma	Quimiotaxia e motilidade
147	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,05 ± 0,13	96,00 ± 2,40	<i>yojN</i>	SEN2251/ YP_002244339	Proteína hipotética quinase sensora do sistema regulatório de dois componentes com RcsBC	Membrana	Sinalização

Tabela 1. Continuação.

N.º do <i>spot</i>	Amostra	pI ± VR (unidades de pH)	MM ± VR (kDa)	Gene	Locus (UniProt/NCBI)	Proteínas preditas		
						Nome	Localização	Função
37	C ₁₂ -AHL (ambas)	7,33 ± 0,11	36,90 ± 0,55	<i>yhiI</i>	SEN3410/ YP_002245476	Proteína hipotética de secreção da família HlyD	Membrana	Transporte
83	C ₁₂ -AHL (ambas)	5,07 ± 0,10	65,81 ± 1,32	<i>btuB</i>	SEN3924/ YP_002245970	Proteína BtuB transportadora de vitamina B12	Membrana	Transporte
160	C ₁₂ -AHL (ambas)	3,88 ± 0,19	37,54 ± 1,88	SEN1522	SEN1522/ YP_002243621	Proteína de membrana externa	Membrana	Transporte
77	C ₁₂ -AHL (ambas)	4,97 ± 0,06	58,09 ± 0,70	<i>yqiK</i>	SEN3041/ YP_002245108	Proteína hipotética exportada	Membrana	Desconhecida
164	C ₁₂ -AHL (ambas)	9,30 ± 0,09	51,89 ± 0,52	SEN1065	SEN1065/ YP_002243192	Proteína hipotética exportada	Desconhecida	Desconhecida
168	C ₁₂ -AHL	6,23 ± 0,09	40,38 ± 0,61	<i>cfa</i>	SEN1620/ YP_002243720	Fosfolipídeos com ácido graxo do tipo ciclopropano sintase	Citoplasma	Biossíntese
182	C ₁₂ -AHL	5,15 ± 0,07	40,25 ± 0,52	<i>hsdS</i>	SEN4285/ YP_002246302	Subunidade M específica do sistema de restrição-modificação (R-M) tipo I	Citoplasma	Metabolismo do DNA
172	C ₁₂ -AHL	5,59 ± 0,06	62,20 ± 0,62	<i>parE</i>	SEN3024/ YP_002245091	Subunidade B da topoisomerase IV	Cromossomo	Metabolismo do DNA
170	C ₁₂ -AHL	6,02 ± 0,06	40,38 ± 0,40	<i>rhaA</i>	SEN3837/ YP_002245888	L-ramnose isomerase	Citoplasma	Metabolismo energetic
174	C ₁₂ -AHL	5,86 ± 0,07	62,20 ± 0,75	<i>sdhA</i>	SEN0684/ YP_002242829	Succinato desidrogenase, subunidade flavoproteína	Citoplasma	Metabolismo energetic
177	C ₁₂ -AHL	4,00 ± 0,20	34,33 ± 1,72	<i>usg</i>	SEN2351/ YP_002244438	Proteína hipotética semialdeído desidrogenase	Citoplasma	Metabolismo energetic
171	C ₁₂ -AHL	5,97 ± 0,05	62,59 ± 0,50	SEN2965	SEN2965/ YP_002245032	Arilsulfatase	Desconhecida	Metabolismo energetic

Tabela 1. Continuação.

N.º do <i>spot</i>	Amostra	pI ± VR (unidades de pH)	MM ± VR (kDa)	Gene	Locus (UniProt/NCBI)	Proteínas preditas		
						Nome	Localização	Função
180	C ₁₂ -AHL	5,83 ± 0,05	35,44 ± 0,28	<i>spaS</i>	SEN2728/ YP_002244800	Proteína secretora associada com virulência	Membrana	Patogenicidade
178	C ₁₂ -AHL	4,31 ± 0,04	35,10 ± 0,35	SEN2624	SEN2624/ YP_002244699	Proteína exportada	Desconhecida	Patogenicidade
181	C ₁₂ -AHL	5,97 ± 0,06	35,55 ± 0,38	<i>fliM</i>	SEN1033/ YP_002243162	Proteína FliM do interruptor na base do motor flagelar	Flagelo	Quimiotaxia e motilidade
173	C ₁₂ -AHL	5,72 ± 0,06	62,20 ± 0,62	<i>mtlA</i>	SEN3507/ YP_002245573	Enzima II específica para manitol do sistema PTS (fosfotransferase)	Membrana	Transporte
175	C ₁₂ -AHL	5,49 ± 0,13	62,59 ± 1,44	<i>nagE</i>	SEN0649/ YP_002242794	Sistema PTS, subunidade II do transportador ABC específico de N-acetilglicosamina	Membrana	Transporte
176	C ₁₂ -AHL	3,99 ± 0,20	43,79 ± 2,19	<i>ompS</i>	SEN1015/ YP_002243144	Proteína S1 da membrana externa S1	Membrana	Transporte
169	C ₁₂ -AHL	4,99 ± 0,03	37,05 ± 0,26	<i>livK</i>	SEN3387/ YP_002245453	Proteína de ligação específica à leucina	Periplasma	Transporte
179	C ₁₂ -AHL	3,79 ± 0,19	35,44 ± 1,77	NPP	NPP	NPP	Desconhecida	Desconhecida

VR = Variação de até 5,0 %.

(ambas) = Proteínas expressas no tratamento controle e no tratamento com C₁₂-AHL, porém mais expresso na amostra referida acima ($p < 0,05$).

NPP = Não houve proteína predita com variação do pI e MM de até 5,0 %.

Os dados fornecidos na Tabela 1 foram agrupados quanto à amostra e à função na célula (Tabela 2). Pode-se notar que no tratamento controle, ou seja, na ausência de C₁₂-AHL, as funções das proteínas preditas foram de biossíntese, de metabolismo energético, de transporte e de função desconhecida, totalizando 10 proteínas. Porém, somente na presença de C₁₂-AHL foram preditas 30 proteínas, divididas entre as funções de metabolismo do DNA, metabolismo energético, patogenicidade, quimiotaxia, motilidade e sinalização (Tabela 2). Campos-Galvão (2012) constatou aumento da expressão de genes de virulência *hilA*, *invA* e *invF*, pertencentes à PAI-1, de *Salmonella* Enteritidis PT4 578 cultivada por 7 h em TSB acrescido de C₁₂-AHL em condição de anaerobiose. Estes dados corroboram os encontrados no presente estudo, uma vez que se observa maior expressão de proteínas de patogenicidade em relação ao tratamento controle. Em *Pantoea stewartii*, também da família Enterobacteriaceae, o sistema QS por AHLs regula a expressão de proteínas de quimiotaxia e motilidade (RAMACHANDRAN e STEVENS, 2013).

Tabela 2. Função das proteínas diferencialmente expressas por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 no tratamento controle (sem C₁₂-AHL) e no tratamento com C₁₂-AHL.

Função das proteínas preditas	Amostras			
	Controle (ambas)	Controle	C ₁₂ -AHL (ambas)	C ₁₂ -AHL
Biossíntese	1	1	0	1
Metabolismo do DNA	0	0	1	2
Metabolismo energético	1	0	6	4
Patogenicidade	0	0	1	2
Quimiotaxia e motilidade	0	0	1	1
Sinalização	0	0	1	0
Transporte	4	0	3	4
Desconhecida	2	1	2	1
TOTAL	8	2	15	15

(ambas) = Proteínas expressas no tratamento controle e no tratamento com C₁₂-AHL, porém mais expresso na amostra referida acima ($p < 0,05$).

A presença de 50 nM de C₁₂-AHL no meio em anaerobiose parece induzir a maior expressão de proteínas de metabolismo energético, de quimiotaxia e de transporte, o que pode estar relacionado com a formação de biofilme. Segundo Watnick e Kolter (2000), durante e após a formação do biofilme há um aumento do metabolismo energético para a produção de exopolissacarídeos e da motilidade para encontrar o local favorável à adesão. Campos-Galvão (2012) observou aumento da expressão de genes relacionados à formação de biofilme, como genes de adesão (*lpfA* e *fimF*), de motilidade

(*fliF*) e de metabolismo energético (*glgC*), em *Salmonella* Enteritidis na presença de C₁₂-AHL. Além disso, Lee *et al.* (2009) destacaram que em *E. coli*, as AHLs levam a uma regulação global de genes, principalmente genes de fase estacionária, que resulta em maior formação de biofilme.

A partir das proteínas preditas e dos seus respectivos genes, foi realizada uma pesquisa na literatura relacionando os genes com o sistema *QS* e com o processo de formação de biofilme (Tabela 3). Os 26 genes que não tiveram relação com o mecanismo de *QS* e com a formação de biofilme não foram apresentados na Tabela 3.

Pode-se observar que nas células do tratamento controle nenhum gene precursor das proteínas preditas apresentou relação com o *QS* e os genes *yfiN* (46) e *ompN* (52) estavam relacionados com a formação de biofilme. A deleção de *yfiN* em *Salmonella* Typhimurium mostrou que este gene tem efeito negativo sobre a formação de biofilme, uma vez que a presença deste gene reduziu a formação de biofilme. No tratamento com C₁₂-AHL a síntese da proteína YfiN foi menor, sugerindo que a presença deste autoindutor diminui a expressão deste gene, favorecendo a formação do biofilme (GARCIA *et al.*, 2004). Já a deleção de *ompN* em *E. coli* mostrou que este gene não influencia à formação de biofilme (TENORIO *et al.*, 2003).

Nas células do tratamento com C₁₂-AHL, dos 30 genes pesquisados, seis já foram relacionados ao *QS*, e estes estão relacionados ao metabolismo energético, transporte, quimiotaxia e motilidade (DeLISA *et al.*, 2001; DAVEY *et al.*, 2003; REN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006; JANSSENS *et al.*, 2008; RADER *et al.*, 2011). As proteínas de quimiotaxia e motilidade, FliM (181) e CheA (84), diferencialmente expressas tiveram os respectivos genes relacionados com *QS*, o gene *fliM* em *Salmonella* Typhimurium (JANSSENS *et al.*, 2008), e o gene *cheA* em *Helicobacter pylori* (RADER *et al.*, 2011). Além disso, nas células cultivadas na presença de C₁₂-AHL foram identificados 10 genes anteriormente discutidos como envolvidos com a formação de biofilme, tendo todos os genes efeito positivo sobre este processo (MACNAB, 1996; TAKEDA *et al.*, 2001; PRAKASH e KRISHNAPPA, 2002; TENORIO *et al.*, 2003; BOLES *et al.*, 2005; BARNHART *et al.*, 2006; KALMOKOFF *et al.*, 2006; RIVAS *et al.*, 2008; FISCHER *et al.*, 2011; YMELE-LEKI *et al.*, 2013).

Estes dados confirmam os obtidos anteriormente em técnicas de cultivo e de microscopia de que há um efeito da C₁₂-AHL sobre a formação de biofilme por *S. enterica* sorovar Enteritidis PT4. Além disso, nota-se que houve expressão de proteínas cujos genes estão relacionados com o mecanismo de *QS*.

Tabela 3. Relação entre os genes precursores das proteínas preditas em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 no tratamento controle (sem C₁₂-AHL) e no tratamento com C₁₂-AHL com o sistema *quorum sensing* e o processo de formação de biofilme.

N.º do spot	Amostra	Gene	Função	Quorum sensing		Formação de biofilme	
				Micro-organismo	Referência bibliográfica	Micro-organismo	Referência bibliográfica
46	Controle (ambas)	<i>yfiN</i>	Biossíntese	-	-	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Garcia <i>et al.</i> (2004)
52	Controle (ambas)	<i>ompN</i>	Transporte	-	-	<i>E. coli</i>	Tenorio <i>et al.</i> (2003)
63	C ₁₂ -AHL (ambas)	<i>yneI</i>	Metabolismo energético	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Wang <i>et al.</i> (2006)	-	-
84	C ₁₂ -AHL (ambas)	<i>cheA</i>	Quimiotaxia e motilidade	<i>Helicobacter pylori</i>	Rader <i>et al.</i> (2011)	<i>Campylobacter jejuni</i>	Kalmokoff <i>et al.</i> (2006)
147	C ₁₂ -AHL (ambas)	<i>yojN</i>	Sinalização	-	-	<i>E. coli</i>	Takeda <i>et al.</i> (2001)
37	C ₁₂ -AHL (ambas)	<i>yhiI</i>	Transporte	-	-	<i>E. coli</i>	Tenorio <i>et al.</i> (2003)
83	C ₁₂ -AHL (ambas)	<i>btuB</i>	Transporte	<i>E. coli</i>	Ren <i>et al.</i> (2004)	<i>E. coli</i>	Rivas <i>et al.</i> (2008)
170	C ₁₂ -AHL	<i>rhaA</i>	Metabolismo energético	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Davey <i>et al.</i> (2003)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Boles <i>et al.</i> (2005)
174	C ₁₂ -AHL	<i>sdhA</i>	Metabolismo energético	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	Fischer <i>et al.</i> (2011)
177	C ₁₂ -AHL	<i>usg</i>	Metabolismo energético	<i>E. coli</i>	DeLisa <i>et al.</i> (2001)	-	-
181	C ₁₂ -AHL	<i>fliM</i>	Quimiotaxia e motilidade	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Janssens <i>et al.</i> (2008)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Macnab (1996)
173	C ₁₂ -AHL	<i>mtlA</i>	Transporte	-	-	<i>Vibrio cholerae</i>	Ymele-Leki <i>et al.</i> (2013)
175	C ₁₂ -AHL	<i>nagE</i>	Transporte	-	-	<i>E. coli</i>	Barnhart <i>et al.</i> (2006)
176	C ₁₂ -AHL	<i>ompS</i>	Transporte	-	-	<i>Salmonella</i> Gallinarum	Prakash e Krishnappa (2002)

(ambas) = Proteínas expressas no tratamento controle e no tratamento com C₁₂-AHL, porém mais expresso na amostra referida acima ($p < 0,05$).

- = Não descrito na literatura.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos mostram que a presença de C₁₂-AHL e furanonas exógenas não aumentaram e não diminuíram o crescimento, a motilidade em massa ou por espalhamento (*swarming*) e nem a motilidade por contração ou por espasmos (*twitching*) de *Salmonella* Enteritidis PT4, cultivada em condições de anaerobiose. Por outro lado, a presença de C₁₂-AHL exógena aumentou a formação de biofilme em poliestireno e as furanonas mostraram efeito antagonista a C₁₂-AHL. A adesão inicial em poliestireno de *Salmonella* Enteritidis PT4 não aumentou e não diminuiu na presença de C₁₂-AHL exógena. A presença de C₁₂-AHL exógenas aumentou expressão de proteínas em *Salmonella* Enteritidis PT4, cultivada em condições de anaerobiose.

Desse modo, a identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas na presença e na ausência de C₁₂-AHL se faz necessária. Uma vez que a função de *sdiA* em *Salmonella* ainda não está estabelecida, o presente trabalho apresenta evidências de sua influência sobre o metabolismo deste patógeno, sugerindo linhas de investigação que podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de patogenicidade de *Salmonella*, visando sua erradicação na indústria de alimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMER, B. M.; VAN REEUWIJK, J.; TIMMERS, C. D.; VALENTINE, P. J.; HEFFRON, F. *Salmonella* Typhimurium encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. **Journal of Bacteriology**, n. 180, v. 5, p. 1185–1193, 1998.

AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. J. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1510-1525, 2008.

ANGULO, F. J.; SWERDLOW, D. L. *Salmonella* Enteritidis infections in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p. 1729–1731, 1998.

ANRIANY, Y.; SAHU, S. N.; WESSELS, K. R.; McCANN, L. M.; JOSEPH, S. W. Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5002–5012, 2006.

ASAD, S.; OPAL, S. M. Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. 236, 2008.

BARNHART, M. M.; LYNEM, J.; CHAPMAN, M. R. GlcNAc-6P levels modulate the expression of Curli fibers by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 14, p. 5212-5219, 2006.

BATCHELOR, S. E.; COOPER, M.; CAHHABRA, S. R.; GLOVER, L. A.; STEWART, G. S. A. B.; WILLIAMS, P.; PROSSER, J. J. Cell-density regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2261-2266, 1997.

BODDICKER, J. D.; LEDEBOER, N. A.; JAGNOW, J.; JONES, B. D.; CLEGG, S. Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1255–1265, 2002.

BOLES, B. R.; THOENDEL, M.; SINGH, P. K. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1210-1223, 2005.

BOUWMAN, C. W.; KOHLI, M.; KILLORAN, A.; TOUCHIE, G. A.; KADNER, R. J.; MARTIN, N. L. Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence plasmid-encoded paralogue of the disulfide oxidoreductase DsbA, essential for biogenesis of plasmid-encoded fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 991–1000, 2003.

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

BRANDA, S. S.; CHU, F.; KEARNS, D. B.; LOSICK, R.; KOLTER, R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1229–1238, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Dados epidemiológicos DTA – período 2000 a 2011**. 2011.

BRONZE, M. S.; GREENFIELD, R. A. **Biodefence Principles and Pathogens**. United Kingdom: Horizon Bioscience, 2005. 838 p.

BURMOLLE, M.; THOMSEN, T. R.; FAZLI, M.; DIGE, I.; CHRISTENSEN, L.; HOMOE, P.; TVEDE, M.; NYVAD, B.; TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; MOSER, C.; KIRKETERP-MOLLER, K.; JOHANSEN, H. K.; HOIBY, N.; JENSEN, P. O.; SORENSEN, S. J.; BJARNSHOLT, T. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 324–336, 2010.

BYRD, C. M.; BENTLEY, W. E. Quieting cross talk – the quorum sensing regulator LsrR as a possible target for fighting bacterial infections. **Cell Research**, v. 19, p. 1229–1230, 2009.

CAMPOS-GALVÃO, M. E. M. **Caracterização do mecanismo de sinalização por quorum sensing em *Salmonella enterica* serovar Enteritidis**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 78p., 2012.

CASTELIJN, G. A.; VAN DER VEEN, S.; ZWIETERING, M. H.; MOEZELAAR, R.; ABEE, T. Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. **Biofouling**, v. 28, n. 1, p. 51–63, 2012.

CHATER, K. F.; HORINOUCI, S. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 9–15, 2003.

CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A.; PELCZER, I.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. **Nature**, v. 415, p. 545–549, 2002.

CHOI, J.; SHIN, D.; RYU, S. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence: the *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 4885–4890, 2007.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; KOURKOUTAS, Y.; NYCHAS, G. J. Inhibition of the early stage of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 2018–2022, 2010.

COENYE, T.; NELIS, H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation e review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, p. 89–105, 2010.

- COLLINS, C. H.; KENNEDY, D. A. **Laboratory-acquired Infections**. 4. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1983.
- CONWAY, B. A. D.; VENU, V.; SPEERT, D. P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5678-5685, 2002.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.
- CRAGO, A. M.; KORONAKIS, V. Binding of extracellular matrix laminin to *Escherichia coli* expressing the *Salmonella* outer membrane proteins Rck and PagC. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, n. 2, p. 495–501, 1999.
- DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1027-1036, 2003.
- DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.
- DeLISA, M. P.; WU, C. F.; WANG, L.; VALDES, J. J.; BENTLEY, W. E. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5239-5247, 2001.
- De KEERSMAECKER, S. C.; SONCK, K.; VANDERLEYDEN, J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. **Trends in Microbiology**, n. 14, v. 3, p. 114–119, 2006.
- DESHUSSES, J. M. P.; BURGESS, J. A.; SCHERL, A.; WENGER, Y.; WALTER, N.; CONVERSE, V.; PAESANO, S.; CORTHALS, G. L.; HOCHSTRASSER, D. F.; SANCHEZ, J.-C. Exploitation of specific properties of trifluoroethanol for extraction and separation of membrane proteins. **Proteomics**, v. 3, p. 1418–1424, 2003.
- Di CAGNO, R.; De ANGELIS, M.; CALASSO, M.; GOBBETTI, M. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. **Journal of Proteomics**, n. 74, n. 1, p. 19-34, 2011.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.
- DOYLE, M. P. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. Foodborne diseases. San Diego: Academic Press, 1990. p. 185-204.
- DUBERN, J. F.; DIGGLE, S. P. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. **Molecular Biosystems**, v. 4, p. 882–888, 2008.

DYSZEL, J. L.; SMITH, J. N.; LUCAS, D. E.; SOARES, J. A.; SWEARINGEN, M. C.; VROSS, M. A.; YOUNG, G. M.; AHMER, B. M. M. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can detect acyl homoserine lactone production by *Yersinia enterocolitica* in mice. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 29–37, 2010.

EBANKS, R. O.; DACANAY, A.; GOGUEN, M.; PINTO, D. M.; ROSS, N. W. Differential proteomic analysis of *Aeromonas salmonicida* outer membrane proteins in response to low iron and *in vivo* growth conditions. **Proteomics**, v. 4, p. 1074–1085, 2004.

FISCHER, A.; YANG, S. J.; BAYER, A. S.; VAEZZADEH, A. R.; HERZIG, S.; STENZ, L.; GIRARD, M.; SAKOULAS, G.; SCHERL, A.; YEAMAN, M. R.; PROCTOR, R. A.; SCHRENZEL, J.; FRANÇOIS, P. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1696–1711, 2011.

FRASER, G. M.; HUGHES, C. Swarming motility. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 630–635, 1999.

FUQUA, C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. **Annual Review Microbiology**, v. 50, p. 727–751, 1996.

FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review of Genetics**, v. 35, p. 439–468, 2001.

GARCIA, B.; LATASA, C.; SOLANO, C.; PORTILLO, F. G.; GAMAZO, C.; LASA, I. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 264–277, 2004.

GIBSON, D. L.; WHITE, A. P.; SNYDER, S. D.; MARTIN, S.; HEISS, C.; AZADI, P.; SURETTE, M.; KAY, W. W. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 22, p. 7722–7730, 2006.

GOERES, D.; LOETTERLE, L.; HAMILTON, M.; MURGA, R.; KIRBY, D.; DONLAN, R. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms, **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 757–762, 2005.

GONZÁLEZ BARRIOS, A. F.; ZUO, R.; HASHIMOTO, Y.; YANG, L.; BENTLEY, W. E.; WOOD, T. K. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *E. coli* through a novel motility quorum sensing regulator (MqsR, B3022). **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 305–16, 2006.

HALL-STOODLEY, L.; HU, F. Z.; GIESEKE, A.; NISTICO, L.; NGUYEN, D.; HAYES, J.; FORBES, M.; GREENBERG, D. P.; DICE, B.; BURROWS, A.; WACKYM, P. A.; STOODLEY, P.; POST, J. C.; EHRlich, G. D.; KERSCHNER, J. E. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 2, p. 202–211, 2006.

HAMILTON, S.; BONGAERTS, R. J. M.; MULHOLLAND, F.; COCHRANE, B.; PORTER, J.; LUCCHINI, S.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HINTON, J. C. D. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. **BMC Genomics**, v. 10, p. 599, 2009.

HARSHEY, R. M.; MATSUYAMA, T. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: Surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 91, p. 8631-8635, 1994.

HAYWARD, M. R.; JANSEN, V.; WOODWARD, M. J. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka, two prevalent serovars associated with different livestock species in the UK. **BMC Genomics**, v. 14, p. 365, 2013.

HEFFERNAN, E. J.; REED, S.; HACKETT, J.; FIERER, J.; ROUDIER, C.; GUINEY, D. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid gene *rck*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 3, p. 953–964, 1992.

HENRICHSEN, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriological Reviews**, v. 36, n. 4, p. 478-503, 1972.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, n. 2-3, p. 95-102, 2004.

HENTZER, M.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T. B.; HEYDORN, A.; ANDERSEN, J. B.; PARSEK, M. R.; RICE, S. A.; EBERL, L.; MOLIN, S.; HOIBY, N.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. **Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 87-102, 2002.

HENTZER, M.; WU, H.; ANDERSEN, J. B.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T. B.; BAGGE, N.; KUMAR, N.; SCHEMBRI, M. A.; SONG, Z.; KRISTOFFERSEN, P.; MANEFIELD, M.; COSTERTON, J. W.; MOLIN, S.; EBERL, L.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **EMBO Journal**, v. 22, n. 15, p. 3803–3815, 2003.

HERMANS, K.; NGUYEN, A. T. L.; ROBERTFROID, S.; SCHOOF, G.; VERHOEVEN, T.; DE COSTER, D.; VANDERLEYDEN, J.; De KEERSMAECKER, S. C. J. Gene expression analysis of *S. Typhimurium* biofilms using differential fluorescence induction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 3, p. 467-478, 2011.

HILLER, K.; GROTE, A.; MANECK, M.; MUNCH, R.; JAHN, D. JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. **Bioinformatics Applications Note**, v. 22, n. 19, p. 2441-2443, 2006.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322–332, 2010.

HOMOE, P.; BJARNSHOLT, T.; WESSMAN, M.; SORENSEN, H. C.; JOHANSEN, H. K. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 266, n. 10, p. 1533–1538, 2009.

HUBER, B.; RIEDEL, K.; HENTZER, M.; HEYDORN, A.; GOTSCHLICH, A.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; EBERL, L. The *cep* quorum sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, v. 147, p. 2517-2528, 2001.

HUGHES, D. T.; SPERANDIO, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 111-120, 2008.

HUMPHREY, T. J.; WILLIAMS, A.; McALPINE, K.; LEVER, M. S.; GUARD-PETTER, J.; COX, J. M. Isolates of *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 with enhanced heat and acid tolerance are more virulent in mice and more invasive in chickens. **Epidemiology and Infection**, v. 117, p. 79–88, 1996.

HUMPHREY, T. J.; WILLIAMS, A.; McALPINE, K.; JORGENSEN, F.; O'BYRNE, C. Pathogenicity in isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis PT4 which differ in RpoS expression: effects of growth phase and low temperature. **Epidemiology and Infection**, v. 121, p. 295–301, 1998.

JANSSENS, J. C. A.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; DE COSTER, D.; VERHOEVEN, T. L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE VOS, D. E.; De KEERSMAECKER, S. C. J. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6639–6648, 2008.

JENSEN, P. O.; GIVSKOV, M.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 292–305, 2010.

JESUDHASAN, P. R.; CEPEDA, M. L.; WIDMER, K.; DOWD, S. E.; SONI, K. A.; HUME, M. E.; ZHU, J.; PILLAI, S. D. Transcriptome analysis of genes controlled by *luxS*/autoinducer-2 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 4, p. 399–410, 2010.

KALMOKOFF, M.; LANTHIER, P.; TREMBLAY, T. -L.; FOSS, M.; LAU, P. C.; SANDERS, G.; AUSTIN, J.; KELLY, J.; SZYMANSKI, C. M. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 4312-43 20, 2006.

KARACA, B.; BUZRUL, S.; TATO, V.; AKÇELIK, N.; AKÇELIK, M. Modeling and predicting the biofilm formation of different *Salmonella* strains. **Journal of Food Safety**, v. 33, p. 503-508, 2013.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 634-644, 2010.

KELLER, L.; SURETTE, M. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 248-258, 2006.

KENDALL, M. M.; SPERANDIO, V. Quorum sensing by enteric pathogens. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, p. 10-15, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.

LATASA, C.; ROUX, A.; TOLEDO-ARANA, A.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; PENADES, J. R.; LASA, I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1322-1339, 2005.

LEDEBOER, N. A.; JONES, B. D. Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 9, p. 3214-3226, 2005.

LEDEBOER, N. A.; FRYE, J. G.; McCLELLAND, M.; JONES, B. D. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3156-3169, 2006.

LEE, J.; MAEDA, T.; HONG, S. H.; WOOD, T. K. Reconfiguring the quorum sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acyl homoserine lactones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1703-1716, 2009.

LILLARD, H. S. Bacterial cell characteristics and conditions influencing their adhesion to poultry skin. **Journal of Food Protection**, v. 48, p. 803-807, 1985.

LYNCH, M. J.; SWIFT, S.; KIRKE, D. F.; KEEVIT, W.; DODD, C. E. R.; WILLIAMS, P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 18-28, 2002.

LYNCH, M.; PAINTER, J.; WOODRUFF, R.; BRADEN, C. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1998-2002. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 55, p. 1-42, 2006.

MACNAB, R. M. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. In: Flagella and motility. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1996. p. 123-145.

MANEFIELD, M.; RASMUSSEN, T. B.; HENZTER, M.; ANDERSEN, J. B.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. **Microbiology**, v. 148, p. 1119-1127, 2002.

- MANGALAPPALLI-ILLATHU, A. K.; LAWRENCE, J. R.; SWERHONE, G. D.; KORBER, D. R. Architectural adaptation and protein expression patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms under laminar flow conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 1–2, p. 109–120, 2008.
- MERRITT, J.; QI, F.; GOODMAN, S. D.; ANDERSON, M. H.; SHI, W. Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1972–1979, 2003.
- MICHAEL, B.; SMITH, J.; SWIFT, S.; HEFFRON, F.; AHMER, B. M. M. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5733–5742, 2001.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 165–199, 2001.
- MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 914–926, 2010.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007.
- NG, W. L.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing network architectures. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 197–222, 2009.
- NICHOLSON, B.; LOW, D. DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 728–742, 2000.
- NUNN, B. L.; SHAFFER, S. A.; SCHERL, A.; GALLIS, B.; WU, M.; MILLER, S. I.; GOODLETT, D. R. Comparison of a *Salmonella* Typhimurium proteome defined by shotgun proteomics directly on an LTQ-FT and by proteome pre-fractionation on an LCQ-DUO. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 154–168, 2006.
- ONG, S. Y.; NG, F. L.; BADAI, S. S.; YURYEV, A.; ALAM, M. Analysis and construction of pathogenicity island regulatory pathways in *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Journal of Integrative Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 145, 2010.
- PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 577–588, 2007.
- PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 363–369, 2009.
- PARSEK, E. C.; GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n. 16, p. 8789–8793, 2000.

- PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, n. 12, p. 27-33, 2005.
- PINTO, U. M.; VIANA, E. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control**, v. 18, n. 10, p. 1322-1327, 2007.
- POULSEN, L. V. Microbial biofilm in food processing. **Food Science and Technology**, v. 32, p. 321-326, 1999.
- PRAKASH, B.; KRISHNAPPA, G. Antigenic analysis of outer membrane proteins of biofilm and planktonic cells of *Salmonella* Gallinarum. **Indian Veterinary Journal**, v.79, n. 10, p. 1001-1004, 2002.
- PROUTY, A. M.; SCHWESINGER, W. H.; GUNN, J. S. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2640–2649, 2002.
- PUI, C. F.; WONG, W. C.; CHAI, L. C.; LEE, H. Y.; TANG, J. Y. H.; NOORLIS, A.; FARINAZLEEN, M. G.; CHEAH, Y. K.; SON, R. Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. **International Food Research Journal**, v. 18, p. 31-38, 2011.
- RADER, B. A.; WREDEN, C.; HICKS, K. G.; SWEENEY, E. G.; OTTEMANN, K. M.; GUILLEMIN, K. *Helicobacter pylori* perceives the quorum sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. **Microbiology**, v. 57, p. 2445-2455, 2011.
- RAMACHANDRAN, R.; STEVENS, A. M. Proteomic analysis of the quorum sensing regulon in *Pantoea stewartii* and identification of direct targets of EsaR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 20, p. 6244-6252, 2013.
- RASMUSSEN, T. B.; MANEFIELD, M.; ANDERSEN, J. B.; EBERL, L.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN, C.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M.. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. **Microbiology**, v. 146, p. 3237–3244, 2000.
- REIMMANN, C.; GINET, N.; MICHEL, L.; KEEL,1C.; MICHAUX, P.; KRISHNAPILLAI, V.; ZALA, M.; HEURLIER, K.; TRIANDAFILLU, K.; HARMS, H.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiology**, v. 148, p. 923–932, 2002.
- REN, D.; SIMS, J. J.; WOOD, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 731–736, 2001.
- REN, D.; BEDZYK, L. A.; YE, R. W.; THOMAS, S. M.; WOOD, T. K. Stationary-phase quorum sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2038-2043, 2004.

REZENDE, C. E.; ANRIANY, Y.; CARR, L. E.; JOSEPH, S. W.; WEINER, R. M. Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7345–7351, 2005.

RIEDEL, K.; TALKER-HUIBER, D.; GIVSKOV, M.; SCHWAB, H.; EBERL, L. Identification and characterization of a GDLS esterase gene located proximal to the *swr* quorum sensing system of *Serratia liquefaciens* MG1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3901-3910, 2003.

RIVAS, L.; FEGAN, N.; DYKES, G. A. Expression and putative roles in attachment of outer membrane proteins of *Escherichia coli* O157 from planktonic and sessile culture. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, p. 155–164, 2008.

RÖMLING, U.; BIAN, Z.; HAMMAR, M.; SIERRALTA, W. D.; NORMARK, S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 722–731, 1998a.

RÖMLING, U.; SIERRALTA, W. D.; ERIKSSON, K.; NORMARK, S. Multicellular and aggregative behavior of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 249–264, 1998b.

RYAN, R. P.; MCCARTHY, Y.; WATT, S. A.; NIEHAUS, K.; DOW, J. M. Intraspecies signaling involving the diffusible signal factor BDSF (cis-2-dodecenoic acid) influences virulence in *Burkholderia cenocepacia*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 5013–5019, 2009.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 247–254, 2005.

SABAG-DAIGLE, A.; SOARES, J. A.; SMITH, J. N.; ELMASRY, M. E.; AHMER, B. M. The acyl homoserine lactone receptor, SdiA, of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium does not respond to indole. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5424-5431, 2012.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M.-A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15, 2011.

SCHAEFER, A. L.; GREENBERG, E. P.; OLIVER, C. M.; ODA, Y.; HUANG, J. J.; BITTAN-BANIN, G.; PERES, C. M.; SCHMIDT, S.; JUHASZOVA, K.; SUFRIN, J. R.; HARWOOD, C. S. A new class of homoserine lactone quorum sensing signals. **Nature**, v. 454, p. 595–599, 2008.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The language of bacteria. **Genes e Development**, v. 15, p. 1468-1480, 2001.

SHROUT, J.; NERENBERG, R. Monitoring bacterial twitter: does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms? **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 4, p. 1995-2005, 2012.

SMITH, J. N.; AHMER, B. M. Detection of other microbial species by *Salmonella*: Expression of the *sdia* regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 4, p. 1357-1366, 2003.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-1070, 2004.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, p. 572-585, 2013.

SONI, K. A.; JESUDHASAN, P. R.; CEPEDA, M.; WILLIAMS, B.; HUME, M.; RUSSELL, W. K.; JAYARAMAN, A.; PILLAI, S. D. Autoinducer AI-2 is involved in regulating a variety of cellular processes in *Salmonella* Typhimurium. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 2, p. 147-153, 2008.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): A novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 809-821, 2002.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 100, n. 15, p. 8951-8956, 2003.

STANLEY, N. R.; LAZAZZERA, B. A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 917-924, 2004.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; De KEERSMAECKER, S. C. J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.

SU, L. H.; CHIU, C. H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Medical Journal**, v. 30, n. 3, p. 210-219, 2007.

SURETTE, M. G.; MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, n. 4, p. 1639-1644, 1999.

TAGA, M. E.; SEMMELHACK, J. L.; BASSLER, B. L. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 42, p. 777-793, 2001.

TAGA, M. E.; MILLER, S. T.; BASSLER, B. L. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 50, p. 1411-1427, 2003.

- TAKEDA, S.; FUJISAWA, Y.; MATSUBARA, M.; AIBA, H.; MIZUNO, T. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC -> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behavior. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 440-450, 2001.
- TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 259–270, 2004.
- TENORIO, E.; SAEKI, T.; FUJITA, K.; KITAKAWA, M.; BABA, T.; MORI, H.; ISONO, K. Systematic characterization of *E. coli* genes/ORFs affecting biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 225, p. 107–114, 2003.
- TOGUCHI, A.; SIANO, M.; BURKART, M.; HARSHEY, R. M. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Critical role for lipopolysaccharide. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6308–6321, 2000.
- ULRICH, R. L. Quorum quenching: enzymatic disruption of n-acyl homoserine lactone mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6173-6180, 2004.
- VIANA, E. D. S.; CAMPOS, M. E. M.; PONCE, A. R.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk. **Biological Research**, v. 42, p. 427-436, 2009.
- WALTERS, M.; SIRCILI, M. P.; SPERANDIO, V. AI-3 synthesis is not dependent on *luxS* in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 5668-5681, 2006.
- WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 296, p. 125-131, 2006.
- WANG, Q.; FRYE, J. G.; McCLELLAND, M.; HARSHEY, R. M. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella* Typhimurium: Genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 169–187, 2004.
- WANG, C.; ZHANG, H. B.; WANG, L. H.; ZHANG, L. H. Succinic semialdehyde couples stress response to quorum sensing signal decay in *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 45-56, 2006.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2675–2679, 2000.
- WHITE, A. P.; GIBSON, D. L.; COLLINSON, S. K.; BANSER, P. A.; KAY, W. W. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 18, p. 5398–5407, 2003.
- WHITE, D. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**. In: WHITE, D. Growth and Cell Division. New York: Oxford University Press, 2007. 583p.

WHITE, A. P.; WELJIE, A. M.; APEL, D.; ZHANG, P.; SHAYKHUTDINOV, R.; VOGEL, H. J.; SURETTE, M. G. A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. **PLoS ONE**, n. 5, v. 7, p. e11814, 2010.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G.P.C. Quorum sensing in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 365-404, 2001.

WIDMER, K. W.; JESUDHASAN, P. R.; DOWD, S. E.; PILLAI, S. D. 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 Pathogens and Disease**, v. 4, n. 1, p. 5-15, 2007.

YMELE-LEKI, P.; HOUOT, L.; WATNICK, P. I. Mannitol and the mannitol-specific enzyme II B subunit activate *Vibrio cholerae* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 4675–4683, 2013.

ZHU, J.; WINANS, S. C. The quorum sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1507-1512, 2001.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1452–1463, 2001.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilm in the food processing industry – Should they be a concerned? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125-148, 1994.