

MOTILIDADE DE *Salmonella entérica* SOROVAR TYPHIMURIUM MEDIADA POR AUTO-INDUTORES

CONCEIÇÃO, R.C.S.^{1*}; STURBELLE, R.T.; TIMM, C.D.; LEITE, F.P.L.

1. INTRODUÇÃO

Quorum Sensing é um termo utilizado para designar um sistema de sinalização que se refere à habilidade das bactérias em responder a moléculas químicas, denominadas de auto-indutores (AIs). As bactérias produzem, liberam, detectam e respondem a estas moléculas sinais e quando estes auto-indutores alcançam uma determinada concentração, decorrente do aumento da densidade celular, ocorre uma ativação de fatores transcricionais que acabam alterando a expressão gênica (Kaper & Sperandio, 2005).

A comunicação intercelular é usada para regular uma grande variedade de processos nas bactérias, incluindo formação de biofilme (Zhu & Mekalanos, 2003), síntese de antibióticos (Takano et al., 2001), indução de fatores de virulência (Bassler, 2002), diferenciação celular e fluxo de nutrientes dentre outros eventos fisiológicos da bactéria (March & Bentley, 2004).

Um dos mais estudados sistemas de sinalização entre as bactérias é o do *Vibrio harveyi* e o do *Vibrio fischeri*. *Vibrio harveyi* é uma bactéria marinha que produz duas moléculas de sinalização diferentes, designadas como auto-indutor 1 (AI-1) (Cao & Meighen, 1989) e auto-indutor 2 (AI-2) (Bassler et al., 1994). O auto-indutor 1 tem sido identificado como uma hemoserina lactona e está primariamente envolvida na comunicação intercelular e o auto-indutor 2 como uma furanona, o qual é produzido pelo produto do gen *lux S* e está envolvido na comunicação entre as espécies.

O AI-2 tem sido utilizado para identificar moléculas de sinalização produzidas por outras bactérias. Através de pesquisas foi observado que *Escherichia coli* (saprófitas e patogênicas), *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium, *Helicobacter pylori* produzem moléculas que são similares ao auto-indutor 2 produzido pelo *Vibrio harveyi* (Forsyth & Cover, 2000). Ainda há a produção de um terceiro auto-indutor, denominado AI-3, sendo responsável por ativar a expressão gênica, que também está envolvido na comunicação entre espécies (Sperandio et al., 2003).

Similar ao AI-2 e AI-3 sendo produzidos pelas células bacterianas, adrenalina e noradrenalina são produzidas pelos mamíferos para comunicação celular (Bearson & Bearson, 2007). Estas são catecolaminas liberadas pelo sistema nervoso simpático, que utilizam a via de sinalização do auto-indutor tipo 3 (AI-3). Estudos têm demonstrado *in vitro* que a adrenalina e a noradrenalina promovem o crescimento celular por fornecer ferro à célula via enterocolina (Freestone et al., 2003), induzem a aderência celular (Chen et al., 2003), ativam a expressão de genes de virulência (Walters & Sperandio, 2006) e aumentam a motilidade bacteriana (Sperandio et al., 2003).

¹Programa de pós-graduação em Biotecnologia-Centro de Biotecnologia - UFPel

²Programa de pós-graduação em Veterinária - UFPel

³Instituto de Biologia- Departamento de Microbiologia e Parasitologia - UFPel

Bactérias do gênero *Salmonella* são importantes patógenos de origem alimentar que utilizam esta via de sinalização *Quorum Sensing*. A expressão do flagelo está entre um dos principais fatores de virulência ativados por este sistema de comunicação (Sperandio et al., 2003).

Flagelina é a principal proteína constituinte do flagelo, apêndices superficiais que estão envolvidos na locomoção bacteriana. O flagelo faz parte do mecanismo sensorial da bactéria que permite ao microrganismo responder a estímulos quimiotáticos ou simplesmente evitar um meio desfavorável a ele, como pHs extremos. A porção antigênica da estrutura é codificada pelos genes *fliC* ou *fliB*. *Salmonella* pode expressar duas flagelinas independentes, sendo uma expressa de cada vez (McQuiston et al., 2008). *Salmonella* que possui esta capacidade são denominadas de difásicas e são capazes de variar de fases, existindo estágios de Fase 1 e Fase 2. A expressão de flagelina é exigida para a invasão de células de *Salmonella* no hospedeiro e ativa NF-κB via TLR 5 (Toll-like receptor 5) (Tallant et al., 2004).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação de auto-indutores presente no meio condicionado e da adrenalina na motilidade de *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. Bactérias e meios de cultura

Foi utilizada uma cepa de *Salmonella entérica* sorotipo Typhimurium, sorotipada pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Manguinhos, RJ), isolada na cidade de Pelotas-RS e mantida em glicerol a 40% a – 18°C. Neste experimento, os meios de cultura utilizados foram o caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma).

2. 2. Reagentes

Foi utilizada a catecolamina Adrenalina (C₉H₁₃NO₃, E1635, Hipolabor) em uma concentração de 500 μM, filtrada com auxílio de um filtro de 0,22 μm (Millipore) e estocada a – 4°C até posterior uso.

2. 3. Preparo do Sobrenadante

Salmonella Typhimurium foi semeada em meio MEM e incubada a 37°C por 7 horas em agitador orbital (150 rpm). Após este período, o cultivo foi centrifugado e o meio condicionado foi filtrado por filtro de 0,22 μm (Millipore). Este foi filtrado e utilizado para condicionar o meio MEM (em duas concentrações de 10 e 50%) com 0,3% de ágar.

3.0. Metodologia

3.1. Ensaio de Motilidade

Salmonella entérica sorotipo Typhimurium foi incubada em BHI a 37°C por 24 horas. A quantificação bacteriana do cultivo foi por espectrofotometria (A600nm). Após o ajuste da densidade ótica do cultivo (DO = 1,0), 500 μL do cultivo foi semeado em 20 mL de caldo MEM e este foi incubado em agitador orbital a 37°C por 7 horas, sendo utilizado como inóculo do experimento, semeando-se 1 μL em cada placa. A motilidade foi avaliada em placas contendo 0,3% de ágar em: MEM (usado como controle, T1),

MEM + 500 µM de adrenalina (T2), MEM + 10% de MEM condicionado (T3), MEM + 50% de MEM condicionado (T4), MEM + 10% de MEM condicionado e 500 µM de adrenalina (T5) e MEM + 50% de MEM condicionado e 500 µM de adrenalina (T6). As placas foram incubadas a 37°C e os halos de motilidade foram mensurados com o auxílio de um paquímetro com 18 horas de incubação.

3.2. Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Diferenças entre os grupos testados foram determinadas usando análise de variância e o teste de Tukey para comparação das médias, usando o Programa Statitix (Statistix, 2003), onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quorum Sensing é uma ferramenta utilizada pela bactéria para acessar a população de sua própria espécie, mas também a população de outras espécies bacterianas em um dado ambiente (Schauder & Bassler, 2001). Este sistema de sinalização tem sido utilizado para estudar a ativação de genes de virulência, dentre estes a expressão do flagelo.

Os resultados obtidos no estudo encontram-se demonstrados na Figura 1. A presença de adrenalina (T2), assim como a utilização de 10% de meio condicionado (T3) não aumentou significativamente a motilidade de *Salmonella Typhimurium* em relação ao controle (T1). Estes dados são contraditórios aos observados por Bearson & Bearson (2007). Estes observaram um aumento na motilidade utilizando 10% de DMEM condicionado, assim como a presença de noradrenalina aumentou a motilidade no meio testado.

No entanto, dois fatores devem ser observados. Os ensaios de motilidade realizados por outros pesquisadores (Bearson & Bearson, 2007; Sperandio et al., 2001 e Sperandio et al., 2002), normalmente, utilizam meios de cultura que diferem do utilizado no nosso trabalho, tais como DMEM, Luria Bertani e meio Triptona (1% de triptona e 0,25% de NaCl). Estes meios são mais enriquecidos do que o MEM possivelmente propiciando uma maior produção de auto-indutores. Segundo fato foi a catecolamina utilizada neste experimento, adrenalina, que segundo Lyte & Ernst (1993) e Freestone et al. (2007) apresenta um efeito menor como promotora de crescimento em relação à noradrenalina.

No entanto, o tratamento que associou 10% de meio condicionado à adrenalina (T5) diferiu significativamente em relação aos tratamentos que utilizaram só adrenalina e só meio condicionado 10%. A associação da adrenalina com o meio condicionado apresentou um efeito sinérgico nas duas concentrações testadas (10 e 50%). Os tratamentos que utilizaram 50% de meio condicionado e 50% de meio condicionado mais adrenalina diferiram estatisticamente entre si e em relação ao controle. O tratamento 50% de meio condicionado mais adrenalina foi o que se observou maior motilidade de *S. Typhimurium*.

Figura 1

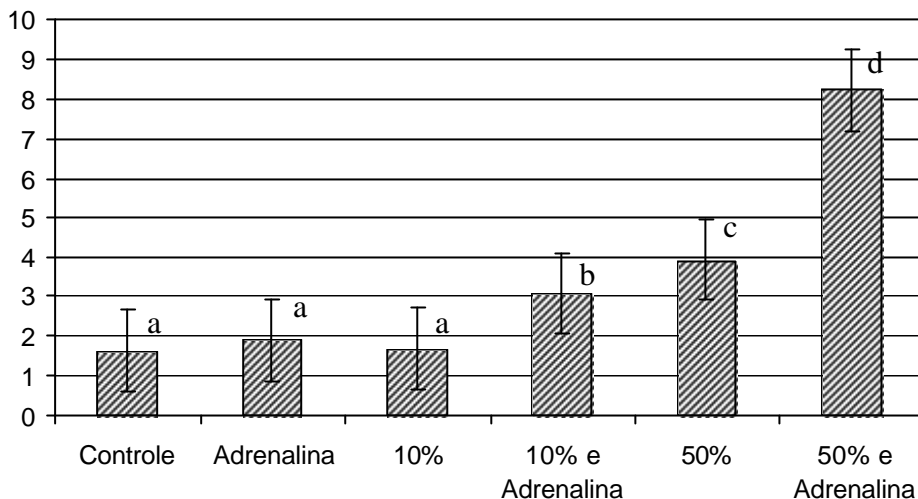


FIGURA 1: Motilidade de *Salmonella Typhimurium*. Médias dos diâmetros observados no ensaio de motilidade de *Salmonella Typhimurium* nos diferentes tratamentos utilizados. Letras diferentes diferem significativamente, $p < 0,05$.

A adrenalina assim como a noradrenalina está presente no trato gastrointestinal do homem e dos animais. Os genes da regulação do flagelo são ativados através do mecanismo de sinalização do AI-3 e as catecolaminas usam esta mesma via de sinalização (Sperandio et al., 2001 e Sperandio et al., 2003).

A expressão de fatores de virulência, quando há uma maior densidade populacional, associado a períodos de estresse onde ocorre a liberação de adrenalina pelo sistema simpático, pode contribuir significativamente para que a bactéria se estabeleça no hospedeiro. Em patógenos, por exemplo, uma expressão gênica de fatores de virulência reduzida é mantida quando a densidade populacional encontra-se baixa, evitando que o organismo hospedeiro inicie uma resposta imune. Quando um número suficiente de bactérias é alcançado, há a expressão dos genes de virulência e, assim, as bactérias são capazes de vencer as defesas do hospedeiro (Donabedian, 2003).

5. CONCLUSÃO

Observamos que a maior motilidade foi no tratamento que associou a adrenalina com 50% de meio condicionado, demonstrando que *Salmonella Typhimurium* utiliza moléculas do hospedeiro e moléculas produzidas por ela mesma, para aumentar seus fatores de patogenicidade e desta forma aumentando a sua virulência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bassler, B.L.; Wright, M.; Silverman, M.R. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. **Molecular Microbiology**, v.13, p.273-86, 1994.

Bassler, B.L. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. **Cell**, v.109, p.421-24, 2002.

Bearson, B.L.; Bearson, S.M.D. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial Pathogenesis**, v.44, n.4, p.271-78, 2007.

Cao, J.G.; Meighen, E.A. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, p. 21670 – 76, 1989.

Chen, C.; Brown, D.R.; Xie, Y.; Green, B.T.; Lyte, M. Catecholamines modulate *Escherichia coli* O157:H7 adherence to murine cecal mucosa. **Shock**, v.20, n.2, p.183-88, 2003.

Donabedian, H. *Quorum sensing* and its relevance to infectious diseases. **Journal of Infection**, v.46, p.207-14, 2003.

Kaper, J.B.; Sperandio, V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. **Infections and Immunity**, v.73, n.6, p. 3197-209, 2005.

Forsyth, M.H.; Cover, T.L. Intercellular communication in *Helicobacter pylori*: *lux S* is essential for the production of an extracellular signaling molecule. **Infection and Immunity**, v.68, n.6, p.3193-99, 2000.

Freestone, P.P.E.; Haigh, R.D.; Lyte, M. Specificity of catecholamine-induced growth in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica*. **FEMS Microbiology Letters**, v.269, p. 221-8, 2007.

Freestone, P.P.; Haigh, R.D; Williams, P.H; Lyte, M. Involvement of enterobactin in norepinephrine-mediated iron supply from transferrina to enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, p.39-43, 2003.

Lyte, M.; Ernst, S. Alpha and beta adrenergic receptor involvement in catecholamine-induce growth of gram-negative bacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.190, n.2, p.447-52, 1993.

McQuiston, J.R.; Fields, P.I.; Tauxe, R.V.; Logsdon Jr.; J.M. Do *Salmonella* carry spare tyres? **Trends in Microbiology**, v.16, n.4, p.142 - 48, 2008.

March, J.C.; Bentley, W.E. *Quorum sensing* and bacterial cross-talk in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.495-502, 2004.

Schauder, S.; Bassler, B.L. The languages of bacteria. **Genes Development**, v.15, p.1468-80, 2001.

Sperandio, V.; Torres, A.G.; Giron, J.A.; Kaper, J.B. *Quorum sensing* is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5187- 97, 2001.

Sperandio, V.; Torres, A.G.; Kaper, J. *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.809-21, 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**, v.100, n.15, p.8951- 56, 2003.

Statistix®. Statistix® 8 Analytical software. Tallahassee, F. L. 2003.

Takano, E.; Chakraborty, R.; Nihira, T.; Yamada, Y.; Bibb, M.J. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB 1 in regulating antibiotic production in *Streptococcus coelicor* A3 (2). **Molecular Microbiology**, v.41, p.1015 – 28, 2001.

Tallant, T.; Deb, A.; Kar, N.; Lupica, J.; Veer, M.J.; DiDonato, J.A. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-κB and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. **BMC Microbiology**, v.4, n.33, p.1-24, 2004.

Zhu, J.; Mekalanos, J.J. Quorum sensing – dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. **Developmental Cell**, n.5, p.647-56, 2003.

Walters, M.; Sperandio, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection Immunity**, v.74, p. 5445-55, 2006.