

MOTILIDADE DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA MEDIADA POR AUTO-INDUTORES

STURBELLE, R.T.¹; CONCEIÇÃO, R.C.S.^{1*}; ROOS, T.B.²; LEITE, F.P.L.³

1. Introdução

Escherichia coli são bactérias móveis Gram-negativas que ocupam o trato gastrointestinal do homem e de animais como comensais ou patógenos. Um dos problemas sanitários que mais causam prejuízo à suinocultura é a diarreia causada por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Esta é a causa infecciosa mais comum de mortalidade em neonatos (Straw et al., 1999) e também no período pós desmame (Zhang et al., 2007). O agente é comensal do intestino delgado e para causar a doença precisa ser capaz de aderir à mucosa (evitando sua eliminação com o trânsito normal do intestino) e de produzir toxinas.

O flagelo faz parte do mecanismo sensorial da bactéria que permite ao microrganismo responder a estímulos quimiotáticos ou simplesmente evitar um ambiente desfavorável. A flagelina é a principal proteína constituinte do flagelo, que são apêndices superficiais que estão envolvidos na locomoção bacteriana. Devido à mobilidade que propicia a bactéria é considerado um fator de patogenicidade importante para bactérias que colonizam mucosas. Recentemente, foi demonstrado que o flagelo possui um papel importante na estimulação de células, na expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias através da interação com receptores Toll-like 5 (TLR5) (Goldsby et al., 2003).

Quorum Sensing é um sistema de sinalização entre as bactérias, os quais produzem substâncias denominadas de auto-indutores (AI). Quando os auto-indutores alcançam uma determinada concentração, decorrente do aumento da densidade celular ocorre uma ativação de fatores transcricionais que acabam regulando a expressão gênica. Em bactérias Gram-negativas, o sistema *Quorum Sensing* possui, basicamente, quatro características principais: síntese e acúmulo da molécula indutora por uma proteína sintase; ligação do indutor à proteína receptora; ligação da proteína receptora ativada à região promotora do gene alvo, atuando como regulador transcricional e ativação ou repressão de características fenotípicas específicas (Gram et al., 2002). Esse sistema de sinalização *Quorum Sensing* tem sido utilizado para melhor entender a patogenicidade das bactérias (Sperandio et al., 2001). Por exemplo, a patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* é dependente da sua capacidade de produzir e secretar diversos produtos extracelulares que estão sob o controle de dois sistemas de *Quorum Sensing*. Estes sistemas são do tipo LuxR-LuxI e funcionam de modo hierárquico (Whitehead et al., 2001).

As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) produzidas pelas células nervosas, que utilizam a via de sinalização do auto-indutor tipo 3 (AI-3) têm um papel significativo na expressão gênica bacteriana, estimulando o crescimento (Lyte & Nguyen, 1997), aderência epitelial e a expressão de fatores de virulência de *Escherichia coli* O157:H7 (Lyte et al., 1996). No que se refere às amostras de EHEC, a ativação do locus LEE, a produção da Shiga toxina e a expressão do flagelo estão entre os principais fatores de virulência induzidos por AI-3 (Sperandio et al., 2003).

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

² Programa de pós-graduação em Veterinária - UFPel

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

Em ETEC, não foram encontrados relatos de expressão gênica envolvidas pelo sistema de *Quorum Sensing*.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação de auto-indutores presentes no meio condicionado e da adrenalina na motilidade de *Escherichia coli* K88.

2. Material e Métodos

2.1. Bactérias e meios de cultura

Escherichia coli K88, utilizada nesse experimento foi mantida a -18°C . Os meios de cultura utilizados foram os caldos Infusão Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma).

2.1. Reagentes

Foi utilizada a catecolamina Adrenalina ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_3$, E1635, Hipolabor) em uma concentração de $500\ \mu\text{M}$, filtrada com auxílio de um filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore) e estocada a -4°C até posterior uso.

2.1. Preparo do Sobrenadante

Escherichia coli K88 foi semeada em ágar sangue por 24h a 37°C , posteriormente colônias isoladas foram semeadas em meio MEM e incubada em agitador orbital a 37°C por 7 horas. Após este período, o cultivo foi centrifugado e o sobrenadante filtrado e estocado a 4°C até uso. O sobrenadante filtrado foi utilizado para condicionar o meio MEM (em duas concentrações de 10 e 50% e associados com adrenalina).

3. Metodologia

3.1. Ensaio de Motilidade em Placas

A motilidade foi avaliada em placas contendo 0,3% de ágar em: T1- MEM (controle), T2- MEM + adrenalina $500\ \mu\text{M}$, T3- MEM + 10% de MEM condicionado, T4- MEM + 50% de MEM condicionado, T5- MEM + 10% de MEM condicionado e $500\ \mu\text{M}$ de adrenalina e T6- MEM + 50% de MEM condicionado e $500\ \mu\text{M}$ de adrenalina. O experimento foi realizado em triplicata.

Escherichia coli K88 foi semeada em ágar sangue de ovino a 5% e incubada a 37°C por 24 horas. Após este período de incubação, colônias isoladas foram semeadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. A quantificação bacteriana do cultivo foi avaliada por densidade ótica com o auxílio de espectrofotômetro ($A_{600\text{nm}}$). Após o ajuste da densidade ótica do cultivo ($\text{DO}=1,0$), $500\ \mu\text{L}$ 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, semeando-se $1\ \mu\text{L}$ por placa. Os tratamentos foram incubados a 37°C e os halos de motilidade foram medidos com 16 horas de cultivo.

3.2. Análise Estatística

Diferenças entre os tratamentos foram determinadas usando análise de variância por medidas repetidas 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

O flagelo faz parte do mecanismo sensorial da bactéria que permite ao microrganismo responder a estímulos quimiotáticos ou simplesmente evitar um

ambiente desfavorável. A expressão, síntese, montagem e motilidade exige a expressão de mais de 50 genes divididos em ao menos 17 operons (Macnab et al., 1996).

Os resultados obtidos em nosso estudo encontram-se na Figura 1.

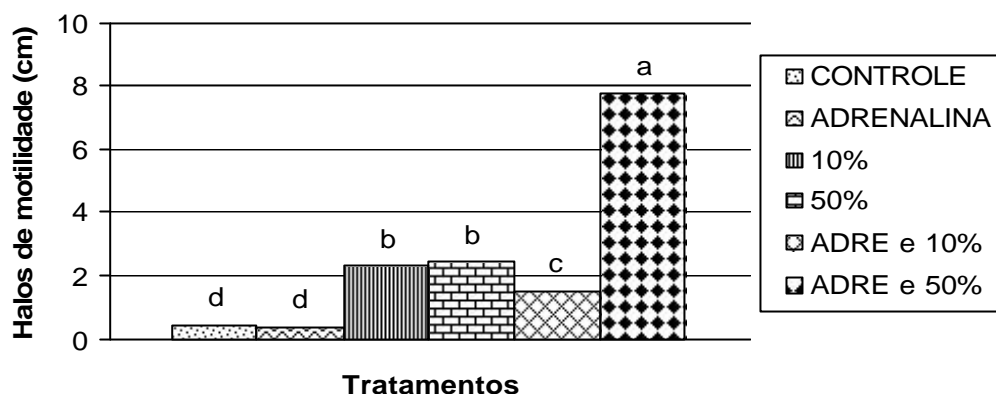


Figura 1: Motilidade de *Escherichia coli*. Médias dos halos de motilidade observados em *Escherichia coli* com auto-indutores, em 16 horas de cultivo. Letras diferentes diferem significativamente, $p < 0,05$.

Nos tratamentos (T1) controle e (T2), adrenalina 500 μ M, foram obtidas as menores médias dos halos de motilidade, não diferindo entre si, mas diferindo dos demais tratamentos.

Os resultados encontrados em (T3) 10% de MEM condicionado e (T4) 50% de MEM condicionado foram similares. A adição de uma maior concentração de meio condicionado não influenciou na motilidade, porém ambos diferiram do controle, demonstrando a existência de auto-indutores no meio condicionado.

Os maiores halos de motilidade foram encontrados em (T6) 50% de MEM condicionado e 500 μ M de adrenalina, diferindo significativamente dos demais tratamentos, demonstrando um efeito sinérgico entre a adrenalina e o meio condicionado. Em (T5), 10% de MEM condicionado e 500 μ M de adrenalina não ocorreu o mesmo. Similar ao AI-3 sendo produzidos pelas células bacterianas, adrenalina e noradrenalina são produzidas pelos mamíferos e liberadas pelo sistema nervoso simpático para comunicação celular (Bearson & Bearson, 2007). As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) produzidas pelas células nervosas, que utilizam a via de sinalização do auto-indutor tipo 3 (AI-3) têm um papel significativo na expressão gênica bacteriana, estimulando o crescimento (Lyte & Nguyen, 1997), aderência epitelial e a expressão de fatores de virulência de *Escherichia coli* O157:H7 (Lyte et al., 1996). Em *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC), a ativação do locus LEE, a produção da Shiga toxina e a expressão do flagelo estão entre os principais fatores de virulência induzidos por AI-3 (Sperandio et al., 2003).

Quando uma elevada concentração de auto-indutores é alcançada no meio externo, o que corresponde a uma alta densidade celular, toda a população pode então iniciar uma ação conjunta com a expressão coordenada de determinados genes (Tjalsma et al., 2004).

A maior expressão do flagelo em enterobactérias na presença de auto-indutores e adrenalina pode estar relacionada ao fator evolutivo. 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 do 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

Nesse estudo observamos que a maior motilidade foi no tratamento que utilizou a adrenalina associada com 50% de meio condicionado, demonstrando que *Escherichia coli* utiliza moléculas do hospedeiro e moléculas próprias, para potencializar seus fatores de patogenicidade.

6. Referências Bibliográficas:

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.

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

Goldsby, R. A., Thomas, J. K., Osborne, B. A., Kuby, J. **Immunology**, fifth edition; W. H. Freeman and Company, New York, 2003.

Gram, L.; Ravn, L.; Rasch, M.; Bruhn, J.B.; Christensen, A.B.; Givskov, M. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.79-97, 2002.

Lyte, M.; Arulanandam, B.P.; Frank, C.D. Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.128, p.392-98, 1996.

Lyte, M.; Nguyen, K.T. Alteration of *Escherichia coli* O157:H7 growth and molecular fingerprint by the neuroendocrine hormone noradrenaline. **Microbios**, v.89, p.197-213, 1997.

Macnab, R.M.; Neidhart, F.C.; Curtiss, R.I.; Ingraham, J.L.; Lin, C.C.; Low, K.B.; Magasanik, B. Flagella and motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington, DC: **American Society for Microbiology Press**, p. 123 – 45, 1996.

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.; Jarvis, B.; Nataro, J.P.; Kaper, J.B. Bactéria-host communication :the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.100, p.8951-56, 2003.

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

Straw, B.E.; D'Allaire, S.; Mengeling, W.L.; Taylor, D.J. **Diseases of swine**. Blackwell Science. 8th edition, 1999.

Tjalsma, H.; Koetje, E.J.; Kiewiet, R.; Kuipers, O.P.; Kolkman, M.; Van Der Laan, J.; Daskin, R.; Ferrari, E.; Bron, S. Engineering of quorumsensing systems for improved production of alkaline protease by *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.569-78, 2004.

Zhang, W.; Zhao, M.; Ruesch, L.; Omot, A.; Francis, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.145–152, 2007.

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.